ANNALES
DE
L'INSTITUT NATIONAL
DE LA
RECHERCHE AGRONOMIQUE

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE

ANNALES DE L'INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

SÉRIE E

ANNALES DE TECHNOLOGIE AGRICOLE

CONSERVATION ET TRANSFORMATION DES PRODUITS AGRICOLES

Année 1956

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
7, rue Keppler – Paris

INFLUENCE DU STADE DE LACTATION SUR LES CARACTÉRISTIQUES DE LA MATIÈRE GRASSE DU BEURRE

PAR

S. KUZDZAL-SAVOIE

Station Centrale de Microbiologie et Recherches laitières
Jouy-en-Josas (Seine-et-Oise)

I. — INTRODUCTION

Lorsqu'on passe d'une région de France à une autre, les propriétés physiques et organoleptiques du beurre se modifient, donnant ainsi naissance à des « crus » de beurre, bien connus des fabricants et des consommateurs.

D'autre part au cours de l'année, les caractéristiques de chacun de ces beurres, qu'ils soient normand, charentais ou fabriqué dans l'Est de la France, varient et à certaines époques des défauts peuvent apparaître. Dans un précédent travail (1) nous avons établi une relation entre les défauts saisonniers des beurres de Normandie et d'Alsace et les modifications de composition de la matière grasse (variation du degré d'insaturation). Le caractère saisonnier des défauts, les variations également saisonnières de l'indice d'iode et l'étude des divers facteurs susceptibles de modifier la nature de la matière grasse nous ont conduit à considérer que l'influence du régime alimentaire était sans doute la plus importante. Cependant elle n'est pas la seule et d'autres facteurs, la race et le stade de lactation, peuvent également jouer un rôle.

Dans les grandes régions beurrières (Normandie, Charente, Est de la France) l'étalement des vélages est de plus en plus recherché et l'amplitude des variations d'un mois de l'année à l'autre s'est atténuée par rapport à la période d'avant-guerre. Les vélages restent cependant plus nombreux au printemps et à l'automne. Toutefois dans des zones limitées où la répartition des vélages peut encore être inégale, la qualité du beurre risque d'être altérée à certaines époques de l'année dans la mesure où le stade de lactation modifie la composition de la matière grasse du lait.

Cette question a été étudiée par divers auteurs. Cependant si les opinions exprimées concordent sur certains points, sur d'autres de sérieuses divergences subsistent.

Il nous a, par suite, semblé utile de reprendre cette étude afin de préciser les limites de l'influence du stade de lactation sur les propriétés du beurre.

II. — REVUE DES ÉTUDES ANTÉRIEURES

Pour étudier la composition de la matière grasse, les auteurs en ont généralement déterminé les divers indices. Dans certaines expériences les vaches étudiées ont été soumises à un régime alimentaire stable et uniforme ; dans d'autres cas, le mode de vie des animaux et leur alimentation ont été ceux en usage dans la région à une saison de l'année déterminée.

Nous groupons ci-dessous les conclusions des auteurs pour chacun des indices étudiés.

L'indice de Reichert (1) diminue au cours de la lactation selon plusieurs auteurs (2-3-4-5-6-7). SWAVING (3) signale cependant qu'il s'élève au début de la lactation pour décroître ensuite. SCHRODT et HENZOLD (4) le confirment et précisent que cette augmentation prend place au cours des premiers jours de la lactation.

HUNZIKER (5), ECKLES et SHAW (6) insistent sur l'accentuation de la baisse de l'indice de REICHERT en fin de lactation.

L'indice de Polenske (2), d'après TAHA el KATIB (7), oscille autour de la moyenne pendant 70 p. 100 du temps de lactation, s'élève ensuite mais retombe rapidement jusqu'à une valeur minima.

L'indice de saponification, (3) étudié par KLEIN et KIRSTEN (2), ECKLES et SHAW (6) suit les mêmes variations que celles indiquées par ces auteurs pour l'indice de REICHERT : le rapport $\frac{\text{indice de saponification}}{\text{indice de REICHERT}}$ restant constant.

Le nombre et la taille des globules gras du lait ont également été étudiés. La taille des globules gras diminue au cours de la lactation (6-8). ECKLES et SHAW (6) précisent, en utilisant la méthode du tube capillaire de BABCOK (9), qu'elle diminue particulièrement vite au début et à la fin de la lactation. SCHELLENBERG (10) confirme ces résultats et attire l'attention sur la relation existant entre la taille moyenne des globules gras et la race laitière : la race Jersey correspondant à la taille la plus élevée, la race Angler à la plus petite.

ECKLES et SHAW (6) ont étudié les variations du **point de fusion de la matière grasse.** Dans l'ensemble et à l'exception des premiers jours

(1) Nombre de ml de solution alcaline décinormale nécessaires pour neutraliser les acides volatils solubles de 5 g de matière grasse.

(2) Nombre de ml de solution alcaline décinormale nécessaires pour neutraliser les acides gras volatils insolubles de 5 g de matière grasse.

(3) Milligrammes de KOH nécessaires pour saponifier 1 g de matière grasse.

de lactation, le point de fusion varie peu jusqu'aux deux derniers mois de lactation pendant lesquels il s'élève. Ces auteurs remarquent qu'il reflète beaucoup plus les variations d'acidité volatile que celles du contenu en oléine de la matière grasse.

En ce qui concerne les variations de **l'indice d'iode** (1) au cours de la lactation, les avis des auteurs sont très divergents. Ainsi SCHRODT et HENZOLD (4) concluent à une diminution constante de l'indice d'iode alors que KLEIN et KIRSTEN (2) constatent l'évolution inverse et que HUNZIKER (5) affirme que les résultats concernant l'indice d'iode sont irréguliers. ECKLES et SHAW (6) notent un manque d'uniformité de l'indice d'iode au début de la période de lactation, mais cependant, en prenant pour base la moyenne générale des résultats, ils indiquent que l'indice d'iode minimum est atteint vers le 4e mois de lactation et s'élève ensuite progressivement et légèrement jusqu'aux deux ou trois derniers mois de lactation pendant lesquels la hausse s'accentue.

BARTLEY et al. (11) estiment que l'indice d'iode, maximum au début de la lactation, s'abaisse d'environ 8 unités jusqu'au 4e ou 5e mois et remonte progressivement jusqu'au tarissement (de trois unités environ).

HANSEN et SHORLAND (12) montrent qu'en Nouvelle-Zélande, la matière grasse des beurres, fabriqués pendant les périodes de début et fin de lactation, présente approximativement le même indice d'iode, généralement élevé, alors qu'il s'abaisse dans la période intermédiaire. Ces auteurs (12) remarquent toutefois que leurs résultats tirés d'analyses effectuées sur des beurres fabriqués à partir de laits de grand mélange, ne permettent pas d'être affirmatifs, les effets propres du stade de lactation et du régime alimentaire n'étant pas séparés. Enfin TAHA EL KATIB (7) conclut à l'augmentation progressive de l'indice d'iode au cours de la lactation.

La remarque précédente de HANSEN et SHORLAND (12) s'avère particulièrement juste : avant d'attribuer à l'influence du stade de lactation telle ou telle modification constatée, il est indispensable de s'assurer que d'autres facteurs de variation n'interviennent pas. En particulier, nous avons déjà rappelé que les caractéristiques de la matière grasse du lait sont modifiées lorsque le régime alimentaire change (13-14*a*). Or, parmi les travaux analysés ci-dessus, certains seulement (5-6-11) ont été poursuivis en respectant l'uniformité et la stabilité des rations distribuées aux animaux d'expérience. Même en opérant de cette façon les conclusions des auteurs restent divergentes : HUNZIKER (5) n'émet pas d'opinion, BARTLEY (11) estime que l'indice d'iode maximum se situe au début de la lactation alors que pour ECKLES et SHAW (6) il ne s'élève nettement qu'à la fin de celle-ci.

En conclusion de ce rappel de travaux déjà poursuivis sur la question

(1) Quantité d'iode en g susceptible de se combiner à 100 g de matière grasse.

de l'influence du stade de lactation sur la composition de la matière grasse, nous avons pensé qu'il y aurait intérêt, dans une étude reprise sur ce même sujet, à insister sur les variations de l'indice d'iode et à suivre les modifications de la matière grasse dès les premiers jours de la lactation, aussitôt après le vélage.

III. — PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Les essais entrepris ont porté sur les vaches de l'étable du Centre National de Recherches Zootechniques à Jouy-en-Josas.

Les conditions dans lesquelles nous étions placés ne nous permettaient pas de leur assurer un régime alimentaire stable ; nous ne pouvions pas non plus éliminer l'influence du climat, c'est-à-dire assurer une température extérieure et un degré hygrométrique constants. Or les variations de la température extérieure peuvent entraîner des modifications dans la nature de la matière grasse (15-16) de même que les changements de mode de vie (14*b*), et au Centre de Jouy-en-Josas, le régime de plein air en été, alterne avec la stabulation en hiver.

C'est pourquoi nous avons décidé de suivre simultanément les variations de composition de la matière grasse du lait des vaches en lactation et celles d'un lait témoin. Ce lait témoin est constitué par le lait de mélange du troupeau de Jouy-en-Josas. A tout moment les vaches étudiées séparément sont soumises aux mêmes conditions extérieures (nature de l'alimentation, climat, mode de vie) que l'ensemble du troupeau. La seule condition qui les en sépare est précisément le stade de lactation.

Parallèlement à l'essai poursuivi à Jouy-en-Josas, nous avons expérimenté dans la région de Poligny (Jura).

Nous avons rappelé plus haut les avis divergents des auteurs en ce qui concerne les variations de l'indice d'iode au cours de la lactation. En particulier BARTLEY et al. (11) dans un travail récent, insistent sur l'insaturation maxima de la matière grasse au début de la lactation. Or quelques analyses effectuées sur des laits de vaches fraîches vêlées, à Trappes (1) et à Grignon (2) au cours des années 1951-1952 ne nous avaient pas permis de confirmer cette opinion.

Comme nous connaissions le mouvement saisonnier de l'indice d'iode du beurre d'Alsace (1), particulièrement bas et stable pendant l'hiver et que nous avions constaté par diverses analyses effectuées à la Station de Recherches laitières, que l'indice d'iode du beurre de la région de Poligny variait de façon similaire, nous avons pensé qu'en hiver l'écart — s'il existe — entre l'indice d'iode de la matière grasse du lait prove-

(1) Ferme E. C. à Trappes (S.-O.).
(2) Ecole nationale d'Agriculture, Gignon (S.-O).

nant de vaches fraîches vêlées et celui d'un lait de mélange de la région devait être particulièrement accentué.

Le beurre fabriqué à l'École Nationale d'Industrie Laitière de Poligny (Jura), à partir du lait livré par les producteurs de cette ville et de deux villages voisins (Toulouse et Villerserine) a été choisi comme beurre de référence.

A. — CHOIX DES ANIMAUX

Au centre de Recherches de Jouy-en-Josas quatre vaches furent choisies pour nos expériences. Le tableau suivant résume les indications les concernant.

Nom	Date de naissance	Race	Date des vélages étudiés	Numéro d'ordre
Églantine	1949	Hollandaise	12-2-53 et 6-3-54	2e et 3e
Astrée	28-7-48	Normande	6-4-53	2e
Alcippe	5-5-49	Normande	29-5-53 et 9-6-54	2e et 3e
Baby 101	5-1951	Normande	27-10-53 et 1-11-54	1er et 2e

Nous avons choisi d'autre part dans une étable du Jura (1), deux vaches de race Pie Rouge de l'Est (Rêveuse et Sirène) inscrites au contrôle laitier, de même âge (4 ans) et dont les vêlages (2e) eurent lieu le 16.2.53 à une heure d'intervalle. Le vêlage suivant (3e) de la vache Rêveuse eut lieu le 3.5.54.

B. — DATES DES PRÉLÈVEMENTS

A Jouy-en-Josas les premiers prélèvements eurent lieu le lendemain du vêlage, les suivants une fois par semaine pendant les deux premiers et les deux derniers mois de lactation et tous les quinze jours durant la période intermédiaire.

Les prélèvements de lait témoin étaient effectués sans date fixe mais en moyenne tous les 12 jours. A Poligny, le premier prélèvement eut lieu 48 h. après le vêlage, le deuxième dix jours plus tard et les suivants à environ un mois d'intervalle. Deux autres prélèvements furent effectués après le 3e vêlage de Rêveuse.

C. — TECHNIQUE ANALYTIQUE

1° **Préparation des échantillons.** — Les prélèvements de lait individuel (généralement de deux litres) étaient constitués par le mélange en parties aliquotes du lait des deux ou trois traites de la journée. Le lait

(1) Ferme de M. L. à Vaux-sur-Poligny (Jura).

était écrémé au laboratoire et la crème transformée en beurre dans un mélangeur Turmix.

Le lait prélevé à Poligny était écrémé sur place et la créme expédiée au laboratoire de Jouy-en-Josas où elle était transformée en beurre comme précédemment. L'échantillon de beurre destiné à l'analyse est fondu au bain-marie dans un godet de centrifugeuse de 50 ml. Après quelques minutes de centrifugation il est maintenu à 45°C environ pendant la pesée des prises d'essai destinées aux diverses déterminations.

2° **Méthodes d'analyse.** — Nous avons déterminé sur tous les échantillons provenant de Poligny et de Jouy-en-Josas, les indices d'iode, de saponification, d'acidité volatile soluble et insoluble, et sur un grand nombre d'entre eux, le point de fusion de la matière grasse.

L'indice d'iode est déterminé par la méthode de Wijs, telle qu'elle est décrite par GROSSFELD (18).

L'indice de saponification ou nombre de Köttstorfer est déterminé par la méthode officielle française (19*a*) de même que les indices d'acidité volatile soluble et insoluble (19*b*). Dans cette méthode on utilise la technique de saponification préliminaire de LEFFMANN-BEAM suivie d'une distillation permettant de recueillir 110 ml de liquide en 30 à 35 minutes. Les résultats sont donnés en ml d'une solution de soude décinormale pour 5 g de corps gras.

Le point de fusion de la matière grasse est le point de goutte UBBELOHDE déterminé au moyen de l'appareil UBBELOHDE (1).

IV. — RÉSULTATS

Pour permettre de suivre les variations des indices de la matière grasse des laits individuels en comparaison avec le lait de mélange du troupeau, nous avons utilisé deux modes de représentation.

En premier lieu (tableaux I-II-III-IV-V-VI-VII et graphiques I-II-III-IV-V-VI-VII) nous avons étudié les variations des indices des laits individuels et du lait témoin en fonction de la saison. Les chiffres portés sur les graphiques et dans les tableaux correspondants représentent la moyenne des résultats obtenus à partir d'échantillons prélevés chaque mois de l'année durant toute l'expérience.

En second lieu (tableaux VIII-IX-X-XI-XII-XIII et graphiques VIII-IX) nous avons étudié les variations des indices des laits individuels en fonction du stade de lactation. Nous avons divisé la durée totale de la lactation de chacune des vaches étudiées en douze périodes, dont la durée varie d'une vache à l'autre mais reste constante au cours d'une même lactation. Nous avons calculé les moyennes des indices des laits individuels

(1) Fabriqué par les Etablissements Prolabo à Paris.

Tableau I

Variations saisonnières des indices du lait d'Eglantine
Vélages : 12 *février* 1953 *et* 6 *mars* 1954.

Mois	Indice d'iode	Indice de saponification	Acidité volatile soluble	Acidité volatile insoluble	Point de goutte Ubbelohde
Février 53	32,1	239,4	35,0	4,4	—
Mars	30,3	239,9	33,2	4,6	—
Avril	33,5	238,9	33,0	4,8	—
Mai	41,7	231,1	32,1	3,5	—
Juin	46,6	221,9	28,2	3,2	—
Juillet	49,1	220,3	25,4	2,7	—
Août	46,2	219,1	24,5	2,6	—
Septembre	48,2	221,7	24,3	2,6	27
Octobre	40,9	228,0	27,5	3,4	23
Novembre.....	36,2	228,3	26,1	2,7	28,4
Décembre	33,4	226,3	25,9	2,9	30,9
Janvier 54	34,3	227,6	23,1	2,4	32,5
Mars	32,4	239,7	34,2	3,8	28,9
Avril.....	31,0	236,0	34,3	4,6	—
Juin	38,5	237,3	33,6	4,3	30,5

Tableau II

Variations saisonnières des indices du lait d'Astrée
Vélage : 5 *avril* 1953.

Mois	Indice d'iode	Indice de saponification	Acidité volatile soluble	Acidité volatile insoluble	Point de goutte Ubbelohde
Avril 53.....	36,4	236,2	35,1	3,7	—
Mai	37,7	230,7	34,2	4,1	27,5
Juin	43,3	226,3	33,8	3,6	32
Juillet	44,1	223,3	29,5	2,8	29
Août	42,6	222,3	30,3	2,6	31,2
Septembre	45,0	220,0	28,4	2,1	28
Octobre	42,4	225,9	28,3	2,7	23,4
Novembre.....	36,5	223,0	24,9	2,5	31,2
Décembre	31,8	229,1	28,3	3,5	32,4
Janvier 54	30,9	229,8	28,5	3,1	32,7
Février	32,3	227,5	26,5	2,8	33,6
Mars	36,5	224,4	27,2	2,7	33,8
Avril.....	39,0	222,0	27,1	2,4	34,3

Tableau III

Variations saisonnières des indices du lait d'Alcippe
Vélages : 29 mai 1953 et 9 juin 1954.

Mois	Indice d'iode	Indice de saponification	Acidité volatile soluble	Acidité volatile insoluble	Point de goutte Ubbelohde
Mai 53	37,4	226,1	29,7	3,1	—
Juin	37,9	229,4	33,0	4,1	30,7
Juillet	39,8	227,1	30,2	3,6	28,6
Août	37,8	228,6	30,6	4,4	—
Septembre	38,5	226,7	26,9	4,5	28
Octobre	40,3	227,0	27,6	3,1	30
Novembre.....	26,3	230,7	25,1	3,2	36
Décembre	27,5	229,7	24,4	3,3	35
Janvier 54	30,3	230,5	26,1	3,4	33,2
Février	30,4	228,6	24,4	3,1	33,9
Mars	35,7	224,6	26,2	2,9	32,5
Avril.....	39,9	219,6	24,2	2,2	33,9
Juin	37,3	234,1	33,3	3,2	—

Tableau IV

Variations saisonnières des indices du lait de Baby 101
Vélages : 27 octobre 1953 et 1er novembre 1954.

Mois	Indice d'iode	Indice de saponification	Acidité volatile soluble	Acidité volatile insoluble	Point de goutte Ubbelohde
Octobre 53	50,1	220,1	27,6	1,3	24,4
Novembre.....	42,7	225,9	33	2,5	26,7
Décembre	32,9	233,6	33,7	4,3	28,6
Janvier 54	32,2	232,9	30,1	4,3	34,0
Février	29,9	234,5	31,2	3,4	—
Mars	28,2	231,5	30,9	3,9	33,0
Avril.....	33,0	231,3	31,4	4,2	30,5
Mai	41,1	236,5	33,4	4,6	29,0
Juin	41,5	232,7	32,8	3,4	31,1
Juillet	43,8	223,8	28,6	2,2	25,8
Août	41,4	224,4	26,6	2,7	—
Novembre.....	41,3	234,5	31,0	4,2	—

Tableau V

Variations saisonnières des indices du lait de mélange C. N. R. Z. Jouy-en-Josas.

Mois	Stade de lactation moyen (en mois)	Indice d'iode	Indice de saponification	Acidité vol. soluble	Acidité vol. insoluble	Point de goutte Ubbelohde
Février 53	3,6	28,0	239,6	34,8	4,7	—
Mars	1,8	30,6	237,5	31,8	4,5	—
Avril	2,1	37,0	235,7	34,5	4,7	—
Mai	2,5	37,0	230,0	31,0	4,2	32
Juin	3,2	44,8	226,6	31,9	3,7	32
Juillet	4,2	44,2	226,3	34,3	2,9	26
Août	5,7	42,2	223,6	28,2	3,1	—
Septembre	6,2	42,5	226,1	28,9	2,6	24,4
Octobre	7.0	40,7	227,0	27,5	3,3	26,9
Novembre	6,7	35,7	226,7	27,7	3,0	30,2
Décembre	6,1	30,6	232,4	30,0	3,4	31,4
Janvier 54	5,1	28,7	234,5	29,8	3,6	—
Février	3,8	27,4	233,6	32,7	4,1	30,2
Mars	2,1	31,6	231,1	31,0	3,9	30,1
Avril	1,9	33,2	235,0	32,9	4,3	30,0
Mai	2,2	35,5	240,7	33,6	5,2	30,5
Juin	2,9	38,8	238,5	35,0	4,4	27
Juillet	3,5	37,7	230,6	32,2	3,1	—
Août	4,6	—	—	—	—	—
Septembre	5,6	44,4	224,9	29,1	2,5	30,3
Octobre	6,0	42,3	228,3	30,2	2,3	—
Novembre	4,5	32,5	236,0	32,3	4,3	—

Tableau VI

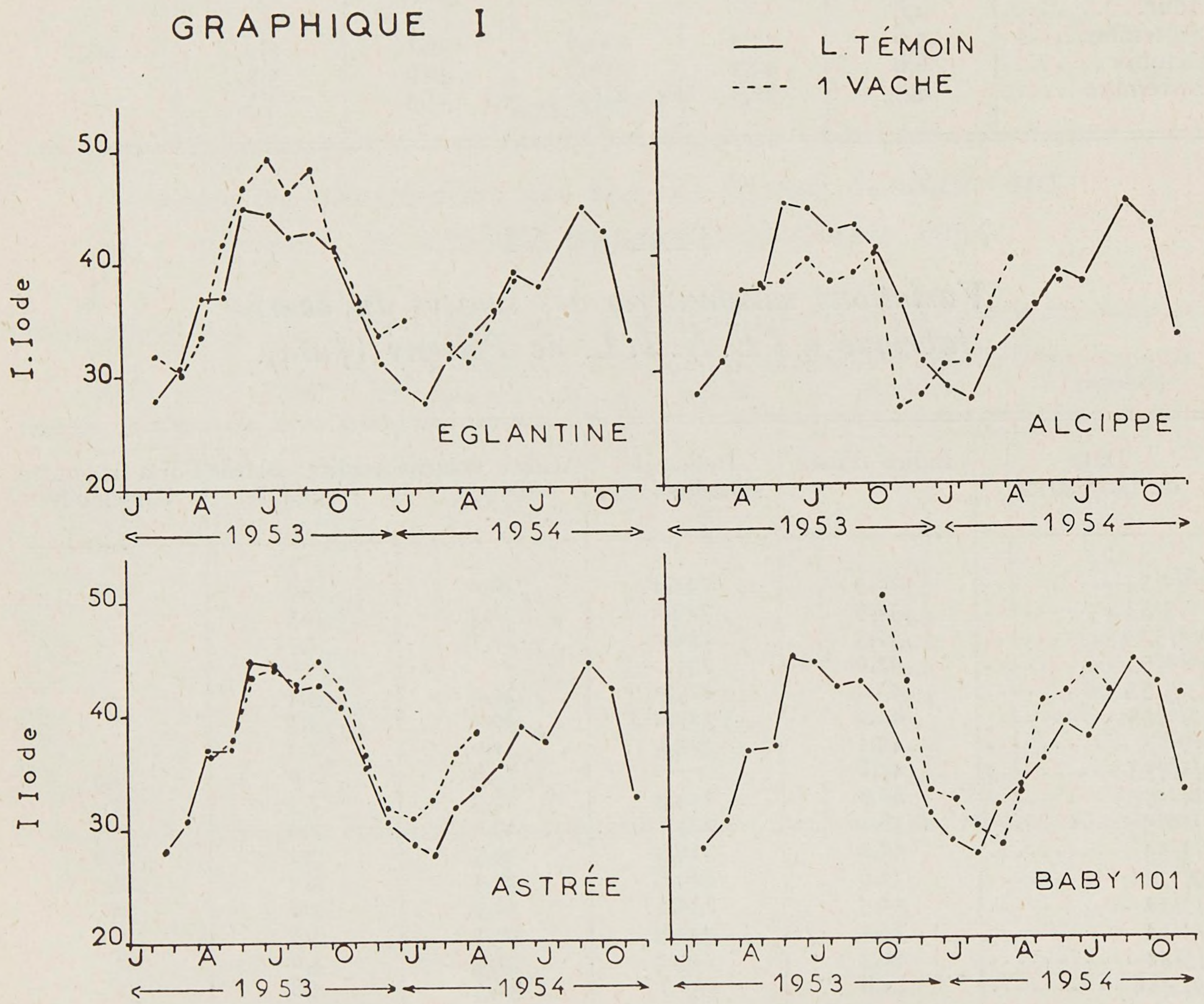
Variations saisonnières des indices du beurre fabriqué à l'E. N. I. L. de Poligny (Jura).

Date de fabrication	Indice d'iode	Indice de saponification	Acidité volatile soluble	Acidité volatile insoluble	Point de goutte Ubbelohde
28/2/53	28,3	241,4	36,8	4,9	—
20/3/53	32,9	229,2	31,3	3,5	—
9/4/53	37,3	236,0	31,7	2,2	—
28/4/53	42,6	231,0	—	—	—
23/5/53	42,2	229,7	31,0	3,4	—
17/6/53	44,0	225,2	30,1	3,1	27
6/9/53	43,4	223,2	31,6	2,3	31
4/10/53	45,6	—	25,8	2,0	29,4
28/10/53	46,7	224,3	26,3	2,3	23
7/12/53	38,1	227,1	29,1	2,4	—
8/1/54	38,2	229,0	29,5	3,2	30,2
27/1/54	33,9	229,8	31,4	3,3	28
3/3/54	33,5	230,0	30,9	3,8	32
4/4/54	33,1	239,0	32,1	4,1	—
7/5/54	41,3	229,2	31,6	4,0	31
29/5/54	42,8	235,1	31,3	3,8	31

Tableau VII

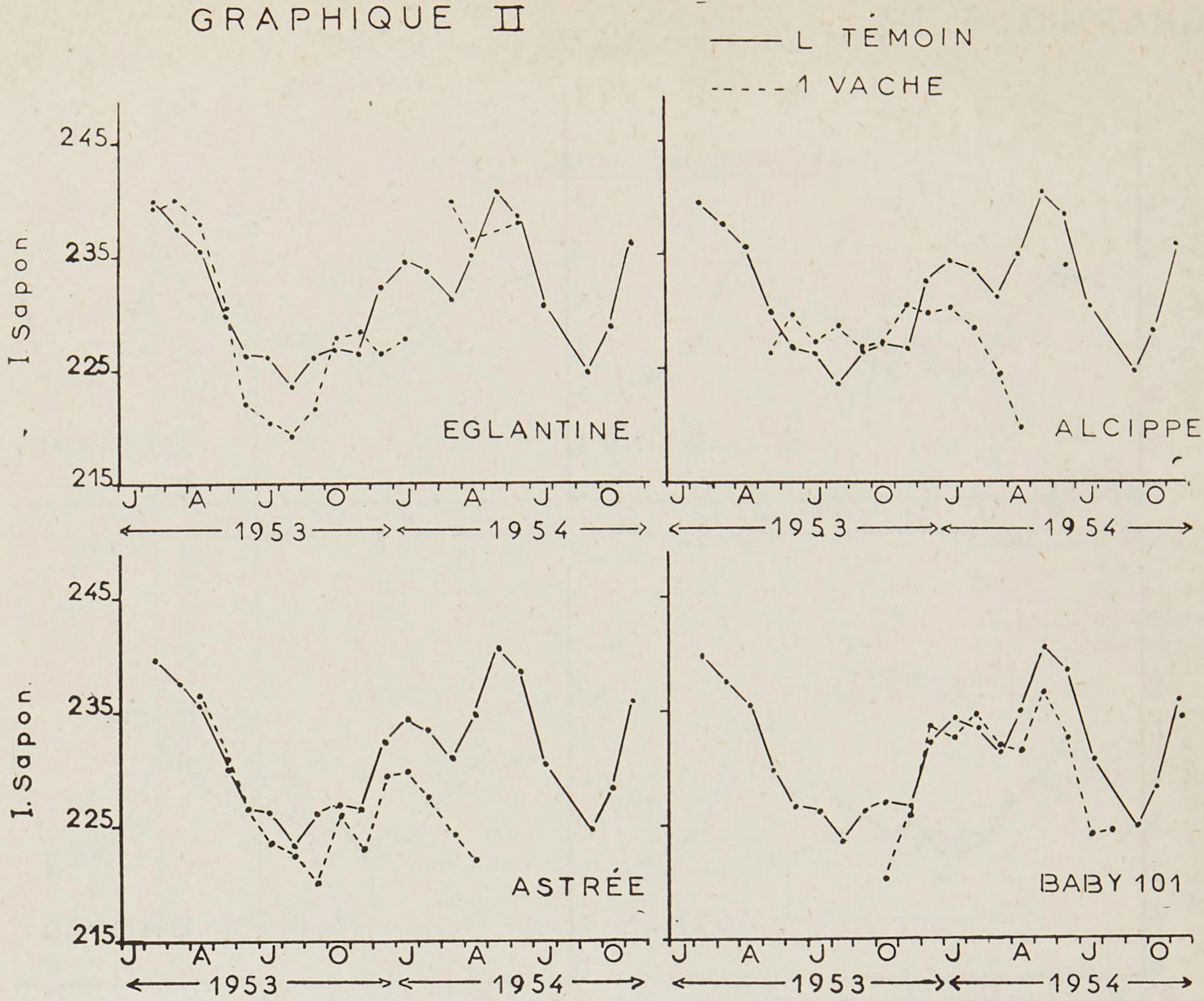
Variations saisonnières des indices des laits de Rêveuse *et* Sirène
Vêlages : 16. 2. 53 (Rêveuse *et* Sirène) *et* 3. 5. 54 (Rêveuse).

Dates des prélèvements	Indice d'iode		Indice de saponification		Acidité volatile soluble		Acidité volatile insoluble		Point de goutte Ubbelohde	
	Rêv.	Sirène	Rêv.	Sirène	Rêv.	Sirène	Rêv.	Sirène	Rêv.	Sirène
18/2/53	32,0	35,1	235,4	236,2	34,0	33,9	3,6	3,1	—	—
28/2/53	32,7	30,0	241,7	242,0	38,3	38,5	4,0	4,7	—	—
20/3/53	34,5	34,1	235,4	235,4	36,4	34,6	4,1	4,2	—	—
9/4/53	31,7	31,9	243,0	245,2	34,8	33,9	4,0	3,9	—	—
29/4/53	48,9	51,8	224,6	225,5	31,0	30,8	2,7	3,3	—	—
23/5/53	46,7	52,7	230,7	226,0	31,1	26,8	5,0	3,1	—	26,2
17/6/53	49,9	54,7	222,4	220,6	28,9	26,7	2,9	2,7	28	28,0
4/8/53	57,1	57,5	223,0	220,1	30,2	27,9	2,8	1,9	25	—
4/9/53	56,3	53,5	220,8	218,9	29,5	28,7	1,9	2,2	27	28,7
3/10/53	57,3	58,6	218,3	217,1	24,8	22,1	2,4	1,9	26,7	—
28/10/53	58,0	57,3	222,2	217,9	26,8	25,1	1,9	2,0	30,2	29,3
5/12/53	35,6	41,5	229,6	226,1	30,0	26,6	3,2	2,9	31,9	—
7/1/54	34,2	—	—	—	25,8	—	3,2	—	30,2	—
27/1/54	30,0	—	233,5	—	29,9	—	3,1	—	31,8	—
4/5/54	43,6	—	226,6	—	34,5	—	3,0	—	29,5	—
29/5/54	37,5	—	237,1	—	36,6	—	4,8	—		



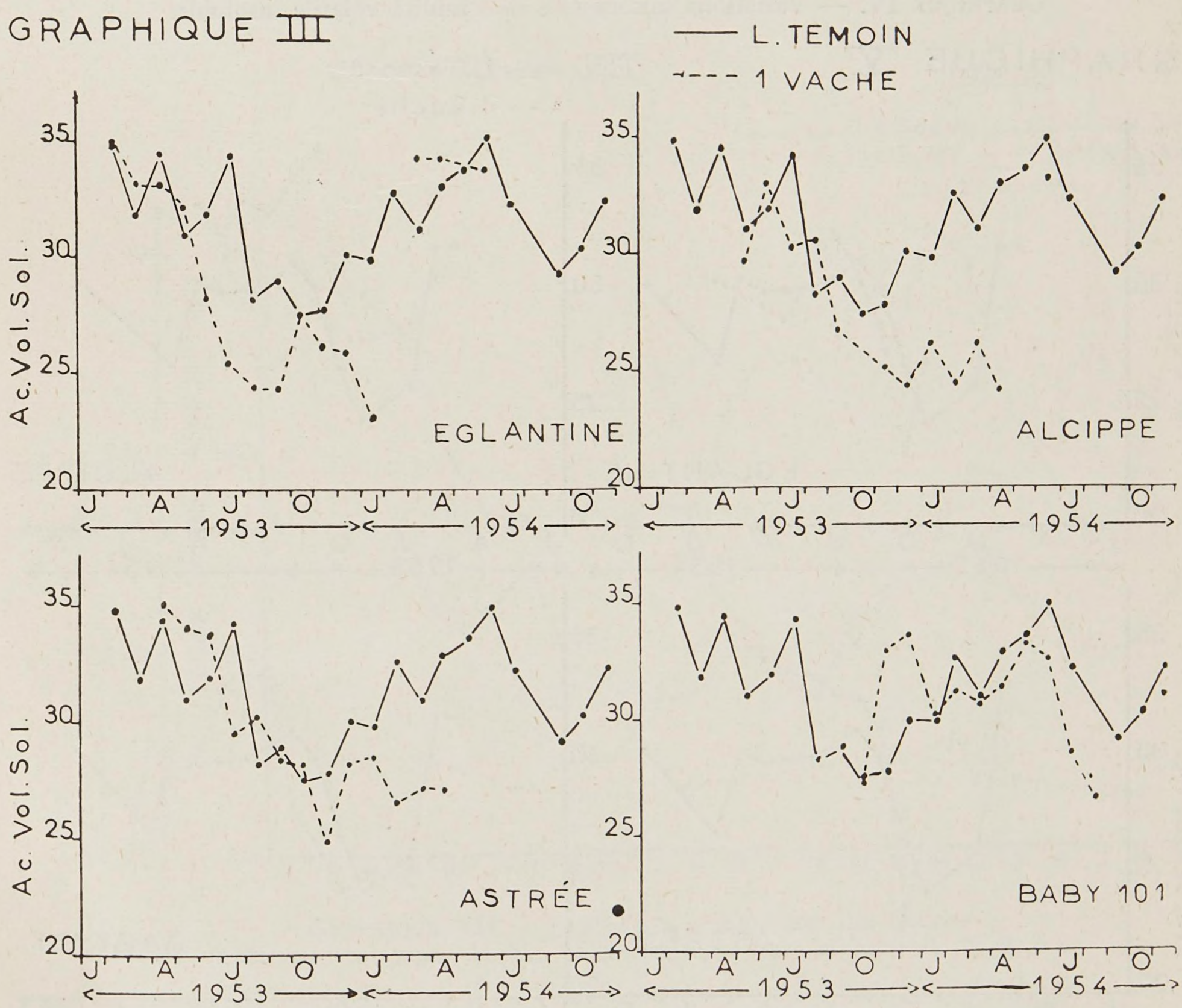
Graphique I. — Variations saisonnières de l'indice d'iode.

GRAPHIQUE II

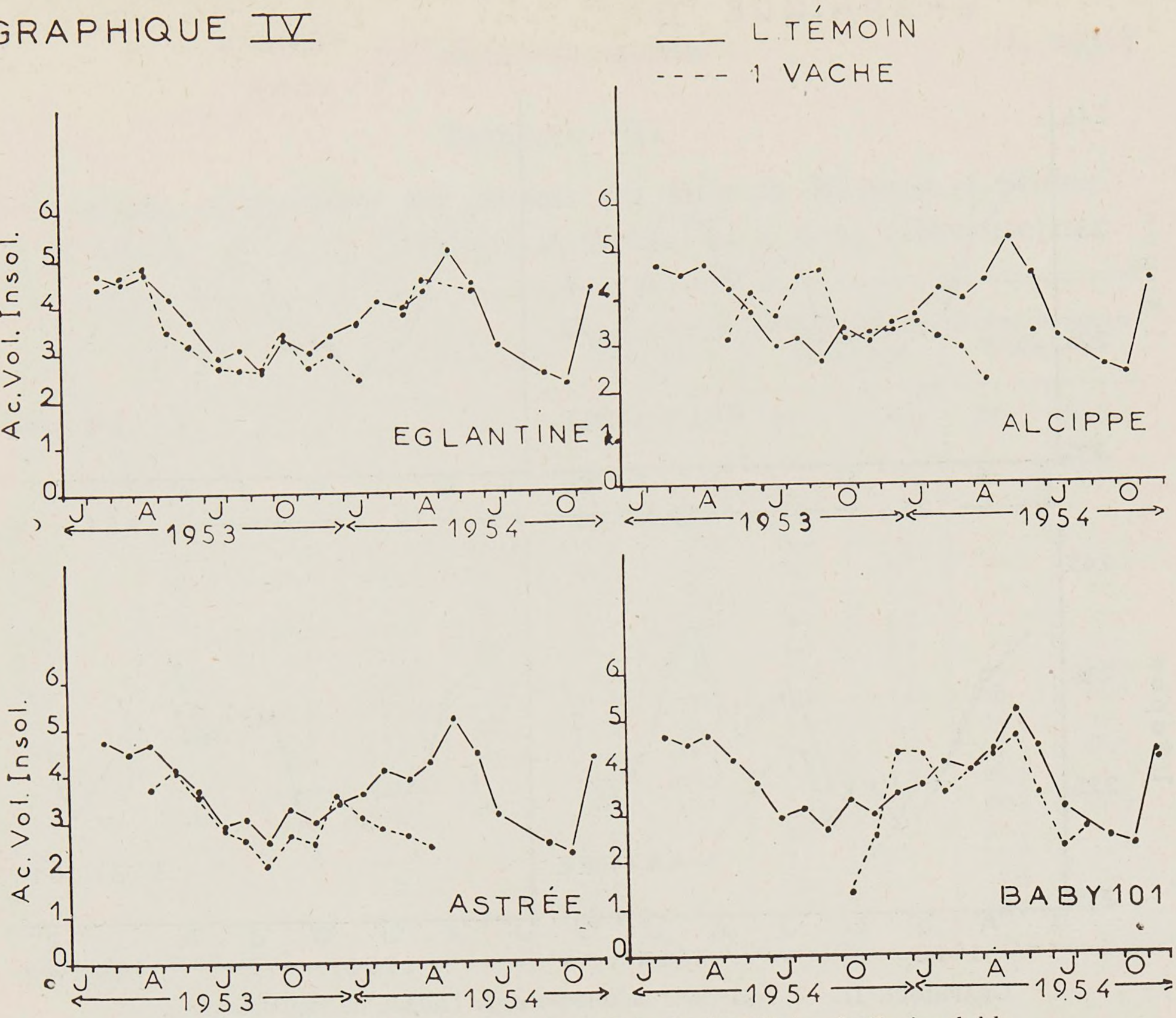


GRAPHIQUE II. — Variations saisonnières de l'indice de saponification.

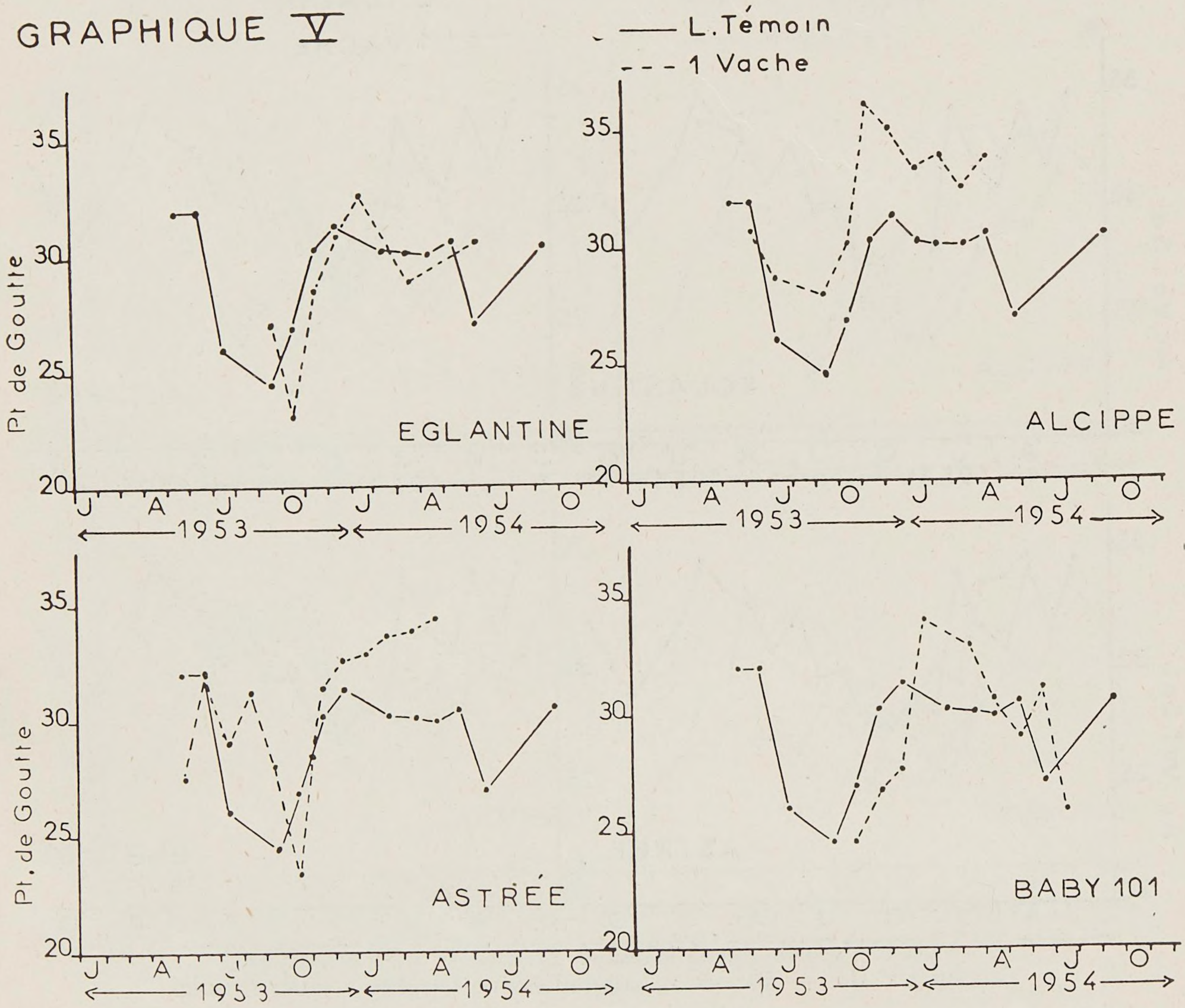
GRAPHIQUE III



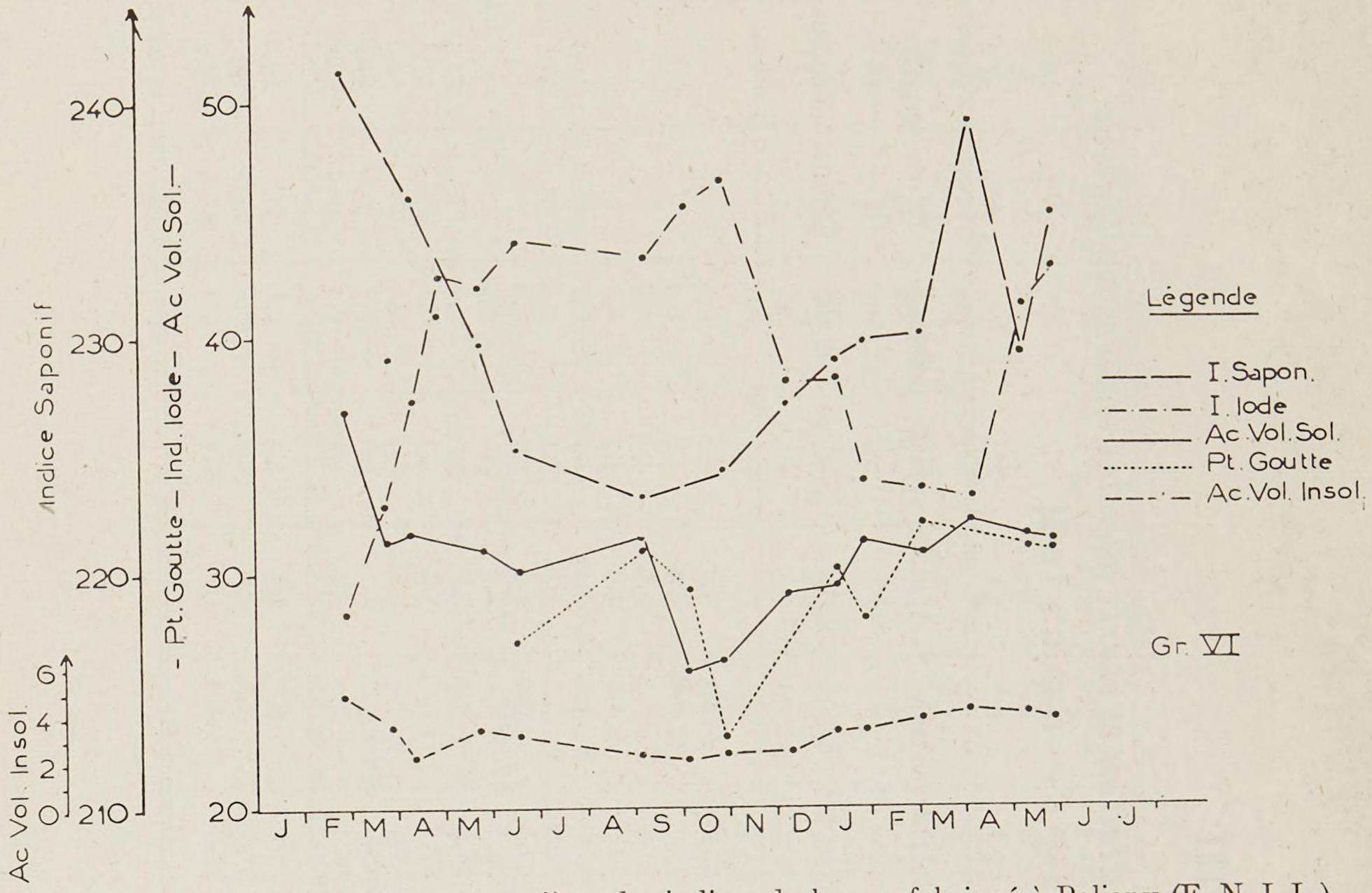
GRAPHIQUE III. — Variations saisonnières de l'acidité volatile soluble.



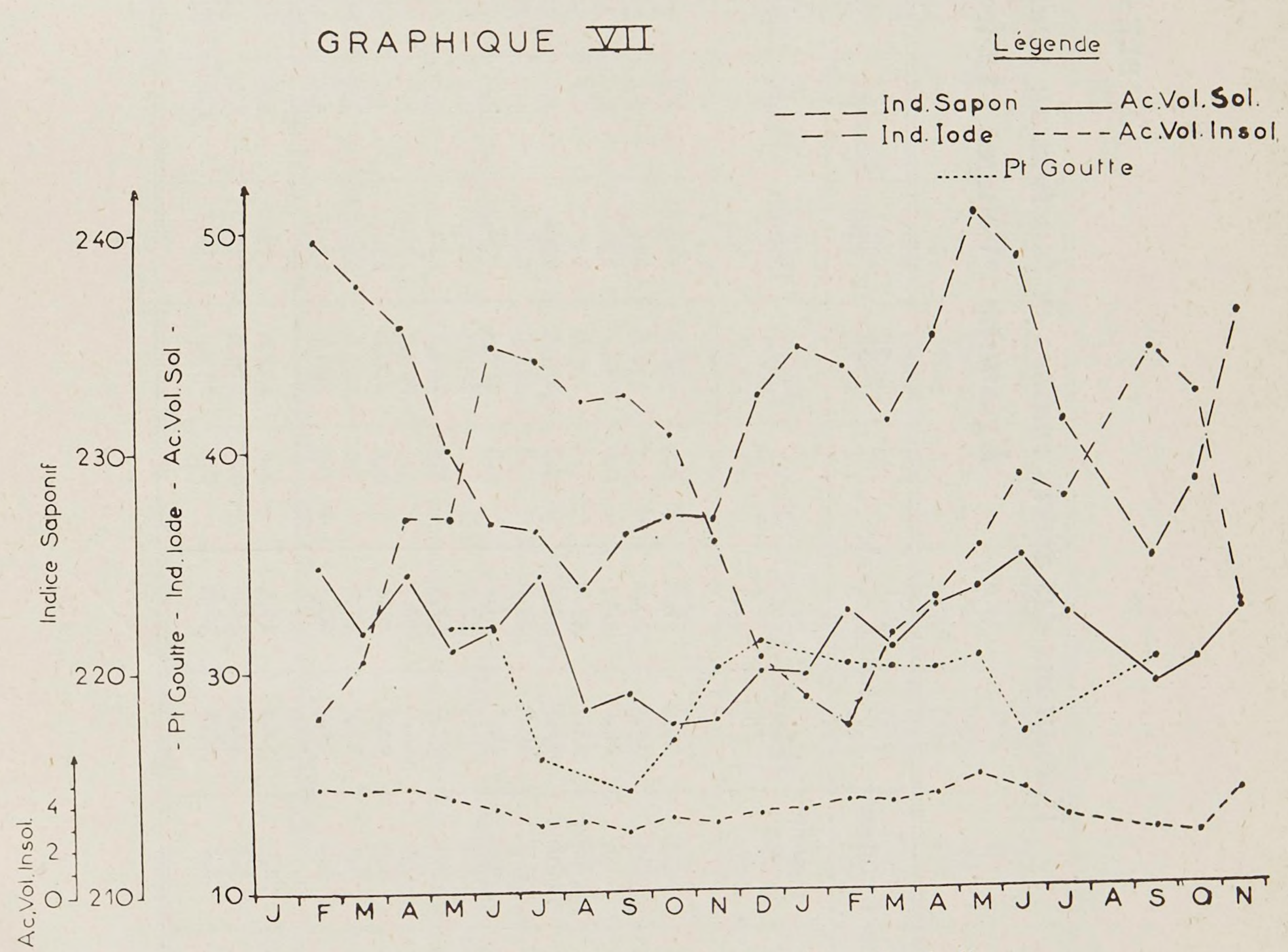
GRAPHIQUE IV. — Variations saisonnières de l'acidité volatile insoluble.



GRAPHIQUE V. — Variations saisonnières du point de goutte.



GRAPHIQUE VI. — Variations saisonnières des indices du beurre fabriqué à Poligny (E. N. I. L.).



GRAPHIQUE VII. — Variations saisonnières des indices de la matière grasse du lait de mélange de Jouy-en-Josas (C. N. R. Z.).

Tableau VIII

Variations des divers indices en fonction du stade de lactation et écarts avec les indices du témoin
Eglantine : Vélages : 12 février 1953 — *6* mars 1954

Stade de lactation		Indice d'iode			Indice de saponification			Acidité volatile soluble			Acidité volatile insoluble			Pt de goutte Ubbelohde		
Églantine	Témoin en mois	Églant.	Témoin	Écart	Églant.	Témoin	Écart	Églant.	Témoin	Écart	Églant.	Témoin	Écart	Églant.	Témoin	Écart
1er j. ..	4,3	28,9	28,0	+ 0,9	238,8	239,6	— 0,8	32,3	34,8	— 2,5	4,5	4,7	— 0,2			
1re p. ..	2,4	31,3	29,2	+ 2,1	238,8	239,3	— 0,5	34,1	33,3	+ 0,8	4,4	4,8	— 0,4			
2e p.....	1,9	29,9	30,7	— 0,8	242,1	236,9	+ 5,2	33,2	31,9	+ 1,3	4,9	4,4	+ 0,5			
3e p.....	2,1	35,7	37,0	— 1,3	235,6	235,7	— 0,1	32,8	34,5	— 1,7	4,9	4,7	+ 0,2			
4e p.....	2,6	41,7	37,0	+ 4,7	231,1	230,0	+ 1,1	32,1	31,0	+ 1,1	3,5	4,2	— 0,7			
5e p.....	3,3	46,6	44,8	+ 1,8	221,9	226,6	— 4,7	28,2	31,9	— 3,7	3,2	3,7	— 0,5	30	32	+ 2,0
6e p.....	4,2	49,1	44,2	+ 4,9	220,3	226,3	— 6,0	25,4	34,4	— 9,0	2,7	2,9	— 0,2			
7e p.....	5,2	—	42,2	—	217,1	223,6	— 6,5	22,1	28,2	— 6,1	2,2	3,1	— 0,9			
8e p.....	6,1	47,9	42,5	+ 5,4	221,1	226,1	— 5,0	25,4	28,9	— 3,5	2,8	2,6	+ 0,2	25	21	+ 4,0
9e p.....	6,8	44,0	40,7	+ 3,3	225,3	227,1	— 1,8	26,4	27,5	— 1,1	3,2	3,3	— 0,1	27	27	0
10e p.....	6,9	39,5	39,0	+ 0,5	226,0	222,2	+ 3,8	26,1	25,4	+ 0,7	2,7	2,4	+ 0,3	26	32,4	— 6,4
11e p.....	6,4	32,3	31,9	+ 0,4	227,6	231,9	— 4,3	26,8	30,6	— 3,8	3,1	3,6	— 0,5	30,8	30,8	0
12e p.....	5,0	34,6	29,4	+ 5,2	226,3	231,7	— 5,4	23,6	28,5	— 4,9	2,4	3,4	— 1,0	31,7	30,6	+ 1,1
1er j. ..	2,5	32,4	27,5	+ 4,9	234,6	234,0	+ 0,6	22,5	32,2	— 9,7	2,5	4,3	— 1,8	37	29,5	+ 7,5
1re p. ..	2,1	32,1	31,6	+ 0,5	239,0	231,0	+ 8,0	34,2	31,0	+ 3,2	4,0	3,9	+ 0,1	24,9	30	— 5,1
4e p.....	2,8	38,5	38,8	— 0,3	237,3	238,5	— 1,2	33,6	35,0	— 1,4	4,3	4,4	— 0,1	30,5	27	+ 3,5

Tableau IX

Variations des divers indices en fonction du stade de lactation et écarts avec les indices du témoin
Astrée : Vélage : 4 avril 1953

Stade de lactation		Indice d'iode			Indice de saponification			Acidité volatile soluble			Acidité volatile insoluble			Pt de goutte Ubbelohde		
Astrée	Témoin en mois	Astrée	Témoin	Écart	Astrée	Témoin	Écart	Astrée	Témoin	Écart	Astrée	Témoin	Écart	Astrée	Témoin	Écart
1er j. ..	2,0	33,7	32,3	+ 1,4	239,9	241,4	— 1,5	31,4	31,6	— 0,2	3,4	3,9	— 0,5			
1re p. ..	2,1	36,8	37,0	— 0,2	235,6	235,7	— 0,1	35,1	34,5	+ 0,6	3,9	4,7	— 0,8			
2e p.....	2,6	37,4	37,0	+ 0,4	230,0	230,0	0	33,9	31,0	+ 2,9	4,1	4,2	— 0,1	27,5	32	— 4,5
3e p.....	3,3	42,8	44,8	— 2,0	225,1	226,6	— 1,5	31,2	31,9	— 0,7	3,2	3,7	— 0,5	32	32	0
4e p.....	4,7	43,3	44,2	— 0,9	223,4	226,3	— 2,9	30,0	34,4	— 4,4	2,8	2,9	— 0,1	26	26	0
5e p.....	5,7	43,9	42,2	+ 1,7	222,1	223,6	— 1,5	30,6	27,6	+ 3,0	2,7	2,8	— 0,1	31,2	28	+ 3,2
6e p.....	6,4	45,2	41,7	+ 3,5	220,0	225,5	— 5,5	28,4	28,7	— 0,3	2,1	2,6	— 0,4	28	22,5	+ 5,5
7e p.....	7,1	40,7	41,7	— 1,0	224,5	226,1	— 1,6	26,7	27,5	— 0,8	2,5	3,1	— 0,6	25,3	28,4	— 3,1
8e p.....	6,4	33,4	32,9	+ 0,5	226,5	229,0	— 2,5	27,0	24,2	+ 2,8	3,1	3,3	— 0,2	32,6	30,7	+ 1,9
9e p.....	5,3	31,7	30,0	+ 1,7	229,1	231,5	— 2,4	28,5	28,4	+ 0,1	3,2	3,3	— 0,1	32,8	31,3	+ 1,5
10e p.....	5,0	30,9	27,9	+ 3,0	230,2	235,7	— 5,5	28,8	32,2	— 3,4	3,0	4,1	— 1,1	32,7	30,2	+ 2,5
11e p.....	3,1	33,5	27,9	+ 5,6	226,5	231,8	— 5,3	26,0	31,0	— 5,0	2,7	3,8	— 1,1	33,8	29,5	+ 4,3
12e p.....	2,0	38,8	32,9	+ 5,9	222,2	232,4	— 10,2	27,3	31,3	— 4,0	2,6	4,1	— 1,5	34,1	30,2	+ 3,9

Tableau X

Variations des divers indices en fonctian du stade de lactation et écarts avec les indices du témoin
Alcippe : vélages : 29 mai 1953 et 9 juin 1954

Stade de lactation		Indice d'iode			Indice de saponification			Acidité volatile soluble			Acidité volatile insoluble			Pt de goutte Ubbelohde		
Alcippe	Témoin en mois	Alcippe	Témoin	Écart	Alcippe	Témoin	Écart	Alcippe	Témoin	Écart	Alcippe	Témoin	Écart	Alcippe	Témoin	Écart
1er j. ..	2,7	37,4	37,8	— 0,4	226,1	228,4	— 2,3	29,7	31,6	— 1,9	3,1	4,4	— 1,3	32	32	0
1re p. ..	3,0	37,8	41,3	— 3,5	228,8	227,5	+ 1,3	32,3	31,7	+ 0,6	3,9	4,0	— 0,15	30,5	32	— 15
2e p.....	4,1	40,0	44,2	— 4,2	226,9	226,3	+ 0,6	30,4	34,4	— 4,0	3,4	2,9	+ 0,5	27,7	26	+ 1,7
3e p.....	4,6	38,5	42,2	— 3,7	228,1	223,6	+ 4,5	29,7	28,2	+ 1,5	4,3	3,1	+ 1,2	30,5	—	—
4e p.....	5,8	37,9	41,4	— 3,5	229,3	—	—	30,8	27,9	+ 2,9	4,3	2,5	+ 1,8	—	28	—
5e p.....	6,4	39,8	42,2	— 2,4	226,7	225,5	+ 1,2	27,4	28,8	— 1,4	4,0	2,7	+ 1,3	30,0	22,5	+ 7,5
6e p.....	7,1	40,0	41,7	— 1,7	227,1	226,2	+ 0,9	27,5	27,5	0	2,9	3,2	— 0,3	29,3	28,4	+ 0,9
7e p.....	6,6	26,3	32,9	— 6,6	230,7	229,2	+ 1,5	25,1	29,2	— 4,1	3,2	3,5	— 0,3	36	29,8	+ 6,2
8e p.....	6,1	27,5	30,4	— 2,9	229,6	232,5	— 2,9	24,4	29,4	— 5,0	3,3	3,4	— 0,1	35	31,3	+ 3,7
9e p.....	5,0	31,7	28,4	+ 3,3	229,6	234,0	— 4,4	25,5	29,3	— 3,8	3,3	3,6	— 0,3	33	—	—
10e p.....	4,5	29,8	28,0	+ 1,9	231,3	234,0	— 2,7	26,4	32,5	— 6,1	3,1	4,0	— 0,9	33,2	30,2	+ 3,0
11e p.....	2,5	33,1	28,6	+ 4,5	225,3	238,5	— 7,2	24,9	31,0	— 6,1	3,1	4,1	— 1,0	33,3	29,5	+ 3,8
12e p.....	1,9	39,3	33,5	+ 5,8	220,7	233,2	— 12,5	24,6	31,9	— 7,3	2,3	4,2	— 1,9	33,7	30	+ 3,7
1er j. ..	2,8	40,5	38,8	+ 1,7	227,9	238,5	— 10,6	28,6	35,0	— 6,4	2,6	4,4	— 1,8	36,3	27	+ 9,3
1re p. ..	3,0	37,4	38,4	— 1,0	234,1	235,9	— 1,8	32,3	34,1	— 1,8	3,2	3,9	— 0,7	—	—	—

Tableau XI

Variations des divers indices en fonction du stade de lactation et écarts avec les indices du témoin
Baby 101 : vélages : 27 octobre 1953 et 1er novembre 1954

Stade de lactation		Indice d'iode			Indice de saponification			Acidité volatile soluble			Acidité volatile insoluble			Pt de goutte Ubbelohde		
Baby	Témoin en mois	Baby	Témoin	Écart	Baby	Témoin	Écart	Baby	Témoin	Écart	Baby	Témoin	Écart	Baby	Témoin	Écart
1er j. ..	7,1	50,1	43,2	+ 6,9	221,9	224,6	— 2,7	27,6	27,1	+ 0,5	1,3	2,5	— 1,2	21	29,4	— 8,4
1re p. ..	6,9	46,9	40,6	+ 6,3	222,3	223,8	— 1,5	31,6	26,1	+ 5,5	2,2	2,5	0	26	30,9	— 4,9
2e p.....	6,4	34,6	31,9	+ 2,7	233,5	231,9	+ 1,6	34,8	30,6	+ 4,2	4,4	3,6	+ 0,8	29,2	30,8	— 1,6
3e p.....	5,3	32,5	29,7	+ 2,8	232,3	231,1	+ 1,2	31,5	28,1	+ 3,4	3,6	3,3	+ 0,3	28	30,6	— 1,6
4e p.....	5,0	30,5	28,7	+ 1,8	234,1	235,8	— 1,7	30,3	30,9	— 0,6	3,8	3,8	0	34	33,5	— 0,5
5e p.....	3,2	—	27,4	—	—	233,6	—	—	32,7	—	—	4,1	—	—	30,2	—
6e p.....	2,1	28,4	30,5	— 2,1	230,1	231,5	— 1,4	30,6	31,2	— 0,6	3,6	3,9	— 0,3	33	30,0	+ 3,0
7e p.....	1,9	29,8	32,6	— 2.8	231,9	234,7	— 2,8	31,2	31,9	— 0,7	4,5	4,4	+ 0,1	30,5	30,0	+ 0,5
8e p.....	2,2	39,6	36,6	+ 3,0	233,4	237,1	— 3,7	32,0	33,6	— 1,6	4,2	4,7	— 0,5	29	30,5	— 1,5
9e p.....	2,6	39,2	36,2	+ 3,0	235,5	241,9	— 6,4	33,7	35,8	— 2,1	4,3	5,3	— 1,0	31	28,7	+ 2,3
10e p.....	3,1	41,8	38,9	+ 2,9	232,6	232,3	+ 0,3	32,8	32,2	+ 0,6	3,3	3,3	0	31,2	—	—
11e p.....	3,8	43,8	41,0	+ 2,8	223,8	227,7	— 3,9	28,6	30,6	— 2,0	2,2	2,8	— 0,6	25,8	—	—
12e p.....	4,5	41,4	—	—	224,4	—	—	26,6	—	—	2,7	—	—	—	—	—
1er j. ..	5,1	43,1	34,8	+ 8,3	223,4	234,8	— 11,4	25,7	33,1	— 7,4	1,6	4,0	— 2,4	—	—	—
1re p. ..	4,6	40,0	32,5	+ 7,5	234,5	236,0	— 1,5	31,0	32,3	— 1,3	4,2	4,7	— 0,5	—	—	—

Tableau XII

Variations des divers indices en fonction du stade de lactation (variations exprimées en unités d'indices)

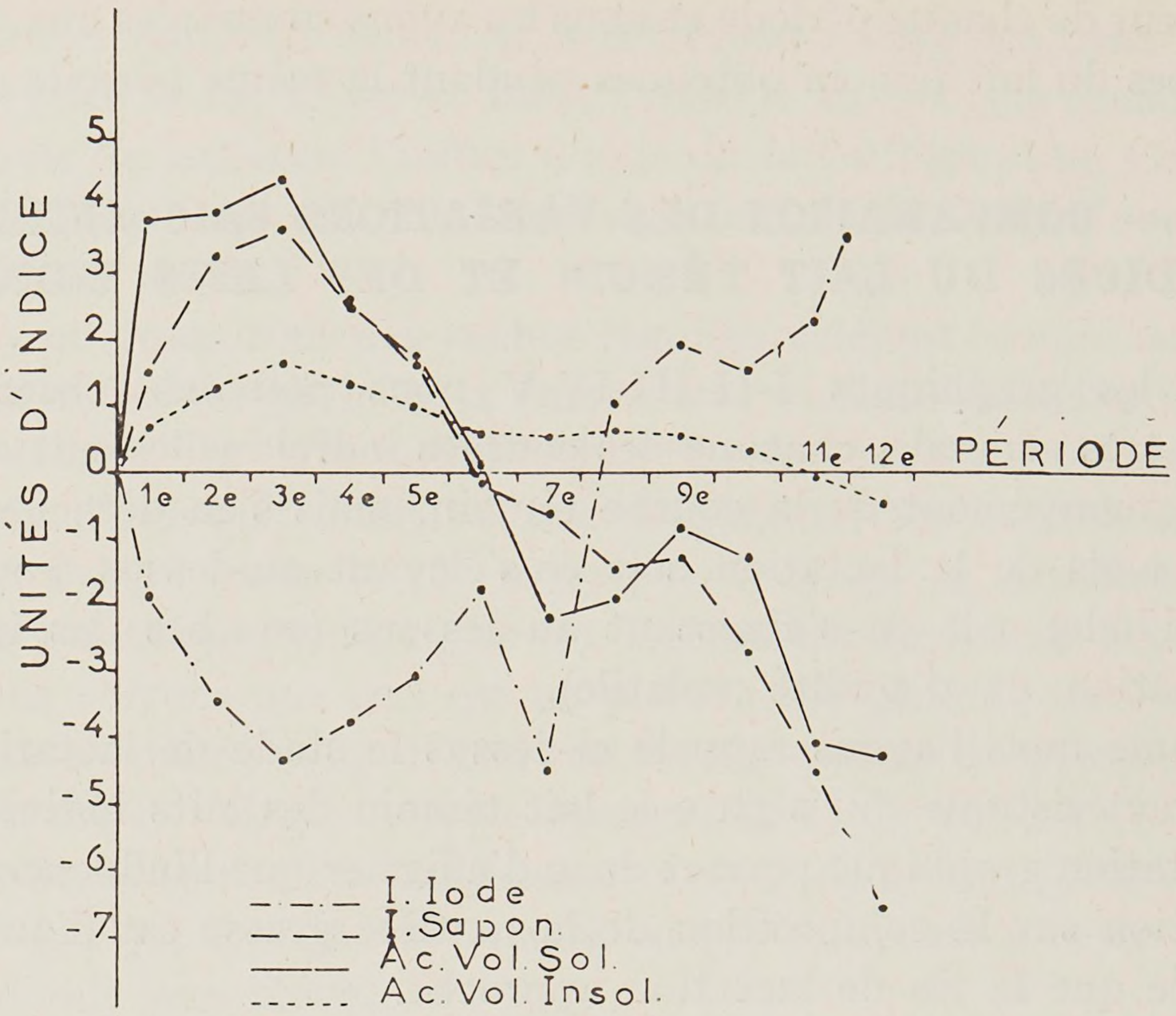
	Indice d'iode	Indice de saponification	Acidité volatile soluble	Acidité volatile insoluble
1er jour à 1re période	— 1,85	+ 1,5	+ 3,8	+ 0,65
1re à 2e période.....	— 1,6	+ 1,8	+ 0,06	+ 0,6
2e à 3e période	— 0,9	+ 0,36	+ 0,5	+ 0,35
3e à 4e période	+ 0,6	— 1,3	— 1,9	— 0,3
4e à 5e période	+ 0,7	— 0,8	— 0,9	— 0,25
5e à 6e période	+ 1,3	— 1,9	— 1,5	— 0,5
6e à 7e période	— 2,7	— 0,4	— 2,3	— 0,03
7e à 8e période	+ 5,5	— 0,9	+ 0,3	+ 0,1
8e à 9e période	+ 0,9	+ 0,2	+ 1,1	— 0,03
9e à 10e période	— 0,4	— 1,4	— 0,6	— 0,26
10e à 11e période	+ 0,76	— 1,8	— 2,8	— 0,4
11e à 12e période	+ 1,3	— 2,1	— 0,2	— 0,4

Tableau XIII

Variations des divers indices en fonction du stade de lactation (variations exprimées en pourcentage d'un indice moyen).

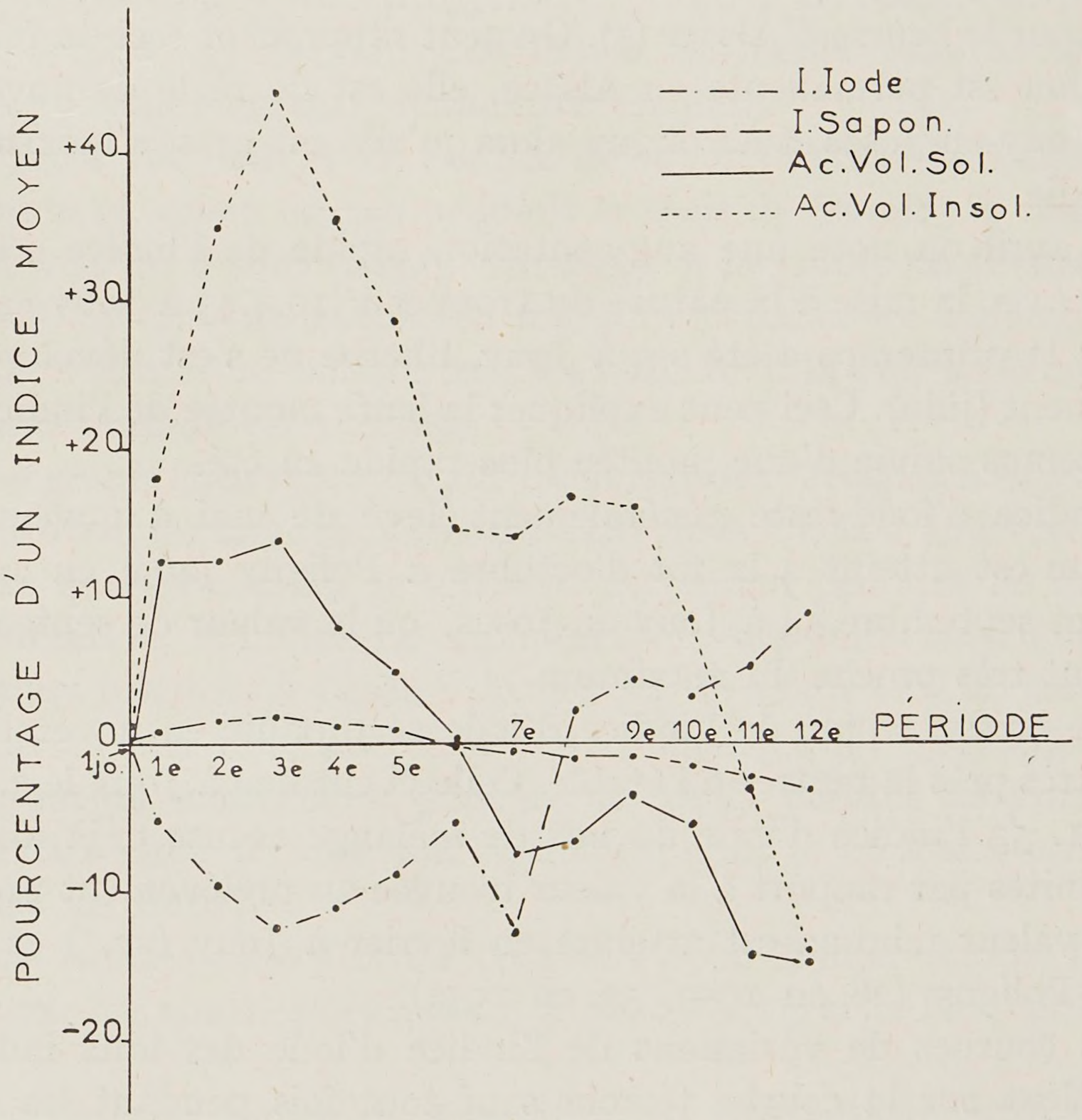
	Indice d'iode	Indice de saponification	Acidité volatile soluble	Acidité volatile insoluble
1er jour à 1re période	— 5,0	+ 0,65	+ 12,3	+ 18,0
1re à 2e période.....	— 4,3	+ 0,78	+ 0,2	+ 17,0
2e à 3e période	— 2,4	+ 0,16	+ 1,6	+ 9,2
3e à 4e période	+ 1,6	— 0,56	— 6,1	— 8,3
4e à 5e période	+ 1,9	— 0,35	— 2,9	— 6,9
5e à 6e période	+ 3,5	— 0,82	— 4,8	— 14,0
6e à 7e période	— 7,3	— 0,17	— 7,4	— 0,8
7e à 8e période	+ 15,0	— 0,39	+ 1,0	+ 2,8
8e à 9e période	+ 2,4	+ 0,08	+ 3,5	— 0,8
9e à 10e période	— 1,1	— 0,61	— 1,9	— 7,3
10e à 11e période	+ 2,1	— 0,78	— 9,0	— 11,2
11e à 12e période	+ 3,5	— 0,92	— 0,6	— 11,2

GRAPHIQUE VIII



GRAPHIQUE VIII. — Variations des indices en fonction du stade de lactation, exprimées en unités d'indice.

GRAPHIQUE IX



GRAPHIQUE IX. — Variations des indices en fonction du stade de lactation, exprimées en pourcentage d'un indice moyen.

à l'intérieur de chaque période et nous les avons comparées aux moyennes des indices du lait témoin obtenues pendant la même période de temps.

A. — COMPARAISON DES VARIATIONS SAISONNIÈRES DES INDICES DU LAIT TÉMOIN ET DES LAITS INDIVIDUELS

Sur les graphiques I-II-III-IV-V nous pouvons observer que, de façon très générale, chacune des courbes individuelles suit en grande partie le mouvement de la courbe témoin, mais s'en détache dans les derniers mois de la lactation, soit en s'élevant au-dessus (courbes des indices d'iode) soit en s'abaissant au-dessous (courbes des indices de saponification et d'acidité volatile).

Comme nous l'avons rappelé ci-dessus le stade de lactation est la seule caractéristique qui sépare le lait témoin des laits individuels. La représentation graphique permet donc d'affirmer que l'influence du stade de lactation sur la composition de la matière grasse est d'autant plus prononcée que la fin de lactation approche.

Nous envisagerons successivement les variations des divers indices.

1° **Indice d'iode** : Les courbes de variations de l'indice d'iode du lait témoin à Jouy-en-Josas et du beurre de Poligny rappellent la courbe établie pour le beurre d'Alsace (1). On peut rapprocher ceci du fait que la stabulation est permanente en Alsace, elle est de règle de novembre à avril à Jouy-en-Josas et à Poligny alors qu'elle est presqu'inexistante en Normandie.

En avril on note une augmentation rapide de l'indice d'iode qui coïncide avec la mise à la pâture du troupeau (10.4.53 à Jouy-en-Josas). En 1954 le printemps a été sec à Jouy, l'herbe ne s'est développée que tardivement (juin). Ceci peut expliquer la lente montée de l'indice d'iode au printemps suivie d'une montée plus rapide en été.

L'indice d'iode reste généralement élevé de mai à novembre. Le maximum est atteint à la fin d'octobre à Poligny (46.4 en 1953), en juin 53 et septembre 54 à Jouy-en-Josas, où la valeur de septembre est cependant très proche du maximum.

Une baisse rapide de l'indice d'iode se produit en novembre ; elle suit de très près la rentrée à l'étable. Celle-ci eut lieu à Jouy le 3. 11. 53 ; le 10. 11. 53 l'indice d'iode du lait de mélange accuse déjà une baisse de 7,1 unités par rapport à la valeur trouvée au prélèvement précédent.

La valeur minima est atteinte en février à Jouy (27,5) et février-mars à Poligny (28 en 1953, 33 en 1954).

Les courbes de variations de l'indice d'iode des laits individuels se modèlent sur la courbe témoin sauf toutefois pendant les derniers mois de lactation.

Il est intéressant de comparer à cet égard le lait des deux vaches Eglantine (vêlée le 12. 2. 53) et Baby (vêlée le 27. 10. 53). Pendant les premiers mois de lactation l'indice d'iode du lait d'Eglantine s'élève de 18 unités environ alors que l'indice d'iode du lait de Baby s'abaisse au contraire de 22 unités.

A Jouy-en-Josas trois des vaches étudiées vêlèrent l'année suivante. Mais les dates de vêlage de 1954 furent très voisines de celles de 1953 et l'indice d'iode des laits individuels prélevés lors du 2e vêlage était peu différent de ce qu'il était l'année précédente. Par contre, Rêveuse à Vaux sur Poligny vêla le 16. 2. 53 puis le 3. 5. 54. L'indice d'iode du premier prélèvement de 1954, est légèrement supérieur à celui du témoin (nous verrons que ceci est un phénomène général) mais surtout il diffère nettement de ce qu'il était en février 53 lors du premier prélèvement suivant le vêlage. A cette époque, la vache était à l'étable et l'indice d'iode de son lait se maintenait autour de valeurs relativement basses. En mai 54, Rêveuse se trouve au pré et accuse à cette époque un indice d'iode plus élevé.

2° **Indice de saponification** : En février 53 l'indice de saponification du beurre de Poligny atteint 241,1 ; une baisse suivie d'une remontée en avril précède une chute progressive, jusqu'à la valeur minima de septembre-octobre 53 (223,2). Cet indice augmente ensuite jusqu'en avril 54, s'abaissant en mai, remontant en juin.

En 1953 à Jouy-en-Josas, l'indice de saponification du lait témoin est maximum et voisin de 240 pendant le mois de février ; le minimum est atteint à la fin d'août (223,6). En 1954, si la pointe de février reste indiquée elle est plus accentuée en mai-juin ; l'indice de saponification dépasse alors 240. Une baisse rapide s'observe jusqu'en septembre 54 où la valeur minima est atteinte.

Sur les graphiques représentant les variations mensuelles des indices de saponification du lait-témoin et des laits individuels à Jouy-en-Josas, on constate que les courbes se séparent nettement pendant les derniers mois de lactation. L'indice de saponification des laits individuels est alors toujours inférieur à l'indice du témoin. Pendant le reste du temps de lactation les variations saisonnières du témoin et des laits individuels suivent le même mouvement général (les deux pointes de janvier et mai 54 de la courbe témoin sont reproduites sur la courbe représentative du lait de Baby).

Notons comme nous l'avons déjà fait pour l'indice d'iode, l'orientation inverse des courbes des indices de saponification de Baby et Eglantine.

Il semble que l'indice de saponification des laits individuels soit supérieur à l'indice du lait témoin pendant les 2e et 3e mois de lactation.

3° **Acidité volatile soluble** : Elle est élevée à la fin de l'hiver et au printemps. Le maximum se situe en février 53 et avril 54 pour le beurre de Poligny ; il est peu net en 1953 et se situe en juin 54 pour le lait de mélange de Jouy. Le minimum est net en octobre pour Poligny (25,8) et Jouy (27,5).

On observe comme pour l'indice de saponification une séparation des courbes des laits individuels et du lait-témoin d'autant plus accentuée que la fin de lactation se rapproche.

Il est à noter qu'Eglantine présente en été 53 (à une période correspondant aux 5e, 6e, 7e mois de lactation) une acidité volatile soluble et un indice de saponification nettement inférieurs à ceux du témoin.

4° **Acidité volatile insoluble** : L'indice de POLENSKE semble suivre un mouvement saisonnier assez voisin de l'indice de REICHERT, avec un minimum en septembre pour le lait de mélange de Jouy (2,6 en 1953 et 2,5 en 1954), et en octobre pour le beurre de Poligny (2,0). La période du maximum est février 53 (4,9) et avril 54 (4,1) à Poligny, avril 53 (4,7) et mai 54 (5,2) à Jouy-en-Josas.

En comparant les courbes des variations de l'acidité volatile insoluble des laits individuels et du lait-témoin à Jouy-en-Josas, on observe une nette différence des valeurs pendant les derniers mois de lactation. Une certaine irrégularité est à noter pendant le reste de la période de lactation quant au mouvement des courbes individuelles et de la courbe témoin : en particulier Alcippe pendant les mois d'été 53 et Baby en décembre et janvier 54 présentent une acidité volatile insoluble nettement supérieure à celle du témoin.

5° **Point de fusion** : Le point de goutte Ubbelohde est minimum en septembre 53 (24,5) et en juin 54 (27) pour la matière grasse du lait de Jouy, et en octobre 53 pour le beurre de Poligny (23).

De l'ensemble des résultats obtenus à partir des laits individuels nous pouvons déduire que le point de fusion de la matière grasse est nettement au-dessus de la valeur du lait-témoin lors du premier prélèvement aussitôt après le vêlage et à nouveau en fin de lactation.

B. — VARIATION DE COMPOSITION DE LA MATIÈRE GRASSE EN FONCTION DU STADE DE LACTATION

Les moyennes mensuelles rapportées sur les graphiques étudiés ci-dessus, sont établies pour chaque mois de l'année et le premier chiffre des courbes individuelles correspond au résultat moyen calculé à partir d'un plus ou moins grand nombre de prélèvements suivant que le vêlage

a lieu au début ou à la fin du mois. Précisément on observe que le premier point de plusieurs courbes représentatives des variations d'indice des laits individuels est nettement séparé du point correspondant de la courbe témoin : sur les courbes d'acidité volatile insoluble des laits d'Alcippe et de Baby l'indice est inférieur à la valeur trouvée pour le témoin et sur les courbes de l'indice d'iode (Baby et Eglantine), l'indice est supérieur au témoin. Or Alcippe et Baby ont vêlé respectivement fin mai et fin octobre 53 ; sur le graphique les indices portés en mai et octobre sont en fait ceux qui correspondent au premier et unique prélèvement effectué le mois du vêlage. On décèle ainsi l'importance de ce premier prélèvement.

Pour étudier avec sûreté l'influence du stade de lactation sur la composition de la matière grasse nous avons calculé les écarts séparant les indices des laits individuels et du lait-témoin pendant chacune des douze périodes que comporte chaque lactation étudiée. Les résultats sont indiqués dans les tableaux VIII-IX-X-XI.

Nous avons d'autre part calculé le stade de lactation auquel correspondait le lait de mélange du troupeau de Jouy-en-Josas. Pour cela nous avons corrigé le stade de lactation moyen des vaches de l'étable (évalué en semaines), au cours des années 1953 et 1954, par un coefficient de pondération représentant pour chacune des vaches étudiées, le rapport de la production laitière individuelle à la production totale hebdomadaire.

Soit :

S : le stade de lactation correspondant au lait de mélange,

a_1 : le stade de lactation de la vache 1,

an : le stade de lactation de la vache n,

A_1 : la production laitière hebdomadaire de la vache 1,

An : la production laitière hebdomadaire de la vache n,

P : la production hebdomadaire totale des vaches de l'étable.

on aura :

$$S = a_1 \times \frac{A_1 \times 100}{P} + \ldots an \times \frac{An \times 100}{P}$$

Le tableau suivant montre les variations du stade de lactation auquel correspond le lait de mélange de Jouy au cours des années 1953-54 (évalué en mois).

Nous avons établi également la valeur du stade de lactation du lait

	Jan.	Fév.	Mars	Avril	Mai	Juin	Juillet	Août	Sept.	Oct.	Nov.	Déc.
1953	5,3	3,6	1,8	2,1	2,5	3,2	4,2	5,7	6,2	7,0	6,7	6,1
1954	5,1	3,8	3,1	1,9	2,2	2,9	3,2	4,6	5,6	6,0	4,5	4,5

de mélange pendant chacune des douze périodes que comporte une lactation complète. Nous avons ensuite groupé les écarts séparant les indices des laits individuels de ceux du lait-témoin pris à un stade de lactation déterminé et constant (3e, 4e, 5e, 6e ou 7e mois), et nous avons calculé les moyennes des variations de ces écarts d'une période à l'autre de la lactation.

Les résultats sont portés sur le tableau XII et le graphique VIII. En ordonnée figurent les variations d'indices calculées en unités et en abscisse les douze périodes de la lactation.

Nous avons d'autre part calculé les pourcentages d'augmentation ou de diminution des différents indices au cours de la lactation en prenant comme base les indices moyens d'iode, de saponification et d'acidité volatile de la matière grasse du lait de mélange de Jouy-en-Josas pendant l'année 1953.

Ces derniers résultats sont portés sur le tableau XIII et le graphique IX.

Le point d'origine des courbes correspond au premier jour de lactation (premier prélèvement).

Les courbes sont « absolues » et valables quelle que soit la période de l'année sur laquelle s'étend la lactation.

L'indice d'iode diminue à partir du 1er jour de la lactation (de 4 unités environ) et s'élève ensuite lentement puis plus rapidement en fin de lactation (de près de 8 unités représentant une augmentation de 20 p. 100).

L'indice de saponification s'élève dès le début de la lactation et s'abaisse progressivement à partir du 3e mois ; en fin de lactation il peut être très bas (216,7 pour Alcippe le 4. 4. 54). Cependant les variations de l'indice de saponification restent faibles en pourcentage (amplitude maxima 4,5 p. 100).

L'acidité volatile est le plus souvent en bonne corrélation avec l'indice de saponification. Ces deux indices sont d'autant plus élevés que les acides gras à bas poids moléculaire sont en plus grande proportion dans la graisse de lait. Cependant si les variations en unités de l'acidité volatile soluble et de l'indice de saponification sont voisines (tableau XII et graphique VIII), l'amplitude des variations de ces mêmes indices en pourcentage des valeurs moyennes respectives, est très différente (25 p. 100 pour l'acidité volatile soluble contre 4,5 p. 100 pour l'indice de saponification).

L'acidité volatile insoluble augmente de près de 50 p. 100 du 1er jour au 3e mois de lactation et s'abaisse ensuite très rapidement jusqu'en fin de lactation.

V. — DISCUSSION

A. — IMPORTANCE RELATIVE DES INFLUENCES EXERCÉES PAR LA SAISON ET PAR LE STADE DE LACTATION

On voit par les résultats qui précèdent que l'influence de la saison sur la composition de la matière grasse du lait reste primordiale. L'influence du stade de lactation s'y superpose et semble affecter toujours de la même façon la composition de la matière grasse quelle que soit la nature de celle-ci à l'époque considérée.

Une influence saisonnière particulièrement importante est la mise au pré au printemps. Or dans le cas d'Eglantine qui se trouve au 3e mois de lactation ou dans celui de Baby qui est au 6e, l'indice d'iode s'élève alors de la même façon. De même à Vaux-sur-Poligny, l'indice d'iode des deux vaches, Rêveuse et Sirène (3e mois de lactation) augmente très fortement au printemps.

Au cours d'une expérience menée à Trappes (1) nous avions également vérifié que le lait de mélange d'un groupe de quatre vaches au 2e mois de lactation mises à la pâture, accusait une augmentation d'indice d'iode de 12 unités par rapport à celui du lait prélevé un mois auparavant quand les vaches étaient encore à l'étable.

B. — RELATION ENTRE LES VARIATIONS DE COMPOSITION DE LA MATIÈRE GRASSE ET L'ACTIVITÉ DE LA GLANDE MAMMAIRE.

Dans l'étude des variations des différents indices de la matière grasse au cours de la lactation, nous avons donné une place importante au premier prélèvement. Celui-ci nous a semblé particulièrement intéressant car l'évolution de la composition de la matière grasse dans les premières lactations, se rattache au problème de la synthèse de la matière grasse du lait.

Lors du 1er prélèvement le lait présente un aspect parfois proche du lait normal, parfois au contraire proche du colostrum, la crème est alors très colorée (orange, même en hiver) et le lait est violacé.

Au cours de la lactation, il semble que les variations de composition de la matière grasse soient en rapport avec l'activité de la glande mammaire. La production maxima en lait ou beurre n'est atteinte qu'environ 15 jours à un mois ou légèrement plus, après la mise-bas. C'est précisément pendant cette période que l'on constate de grandes variations dans les indices étudiés. L'acidité volatile soluble augmente alors très rapidement et n'amorce une diminution qu'après le 2e mois, au moment où

(1) Ferme E. C. à Trappes (S.-O.).

la production laitière est stationnaire ou déjà en baisse. L'augmentation de l'acidité volatile soluble paraît donc être en relation directe avec une augmentation de la production laitière, comme si elle représentait la première phase de la fabrication de la matière grasse du lait. Nous trouvons confirmation de cette idée, non seulement tout au cours de la lactation, mais précisément lorsque survient une baisse fortuite de production. Ainsi la rentrée à l'étable en novembre est un événement qui trouble les habitudes des vaches et entraîne une diminution de production de lait que l'on observe nettement pour les trois vaches Astrée, Alcippe et Eglantine (Baby ayant vêlé à l'étable). En se reportant aux tableaux détaillés des résultats, on peut noter alors une baisse nette mais temporaire de l'acidité volatile et de l'indice de saponification.

Si l'acidité volatile augmente au début de la lactation, l'indice d'iode s'abaisse au contraire pendant cette période : ce qui peut s'expliquer par le fait que l'augmentation des acides volatils provoque une diminution des acides insaturés pour un même poids de graisse. Le phénomène inverse se produit en fin de lactation : à l'élévation de l'indice d'iode correspond une baisse très prononcée de l'acidité volatile, mais ce serait seulement la proportion relative des acides insaturés, saturés et volatils qui serait sous la dépendance de la période de lactation. Ceci serait en accord avec les travaux (20) selon lesquels tous les acides gras du lait jusqu'à — et y compris l'acide palmitique — seraient formés par condensation progressive d'un composé en C_2 dérivé de l'acétate ; leur formation étant alors en relation directe avec l'activité de la glande mammaire qui serait sans influence sur les acides stéarique et oléique dérivant des acides gras du sang ou de précurseurs autres que l'acétate.

Eckles et Shaw (6) dans leur très belle étude sur l'influence du stade de lactation sur la composition de la matière grasse du lait, ne signalent pas les variations importantes qui ont lieu au cours des premières lactations. Schrodt et Henzold (4) et Swaving (3) en rappellent cependant l'existence en ce qui concerne l'acidité volatile.

Si l'on reprend les résultats de Eckles et Shaw (6) on voit que les échantillons de lait sont prélevés au plus tôt cinq jours après le vêlage. Toutefois la matière grasse du lait de quatre vaches sur les onze étudiées, présente lors de la première semaine de lactation un indice d'acidité volatile nettement inférieur à celui de la semaine suivante.

C. — VARIATIONS RELATIVES DES INDICES D'IODE ET DE SAPONIFICATION

Nous avons vu qu'en général, dans les variations saisonnières comme au cours de la lactation le mouvement de l'indice d'iode est inverse de celui des indices de saponification et d'acidité volatile : en

effet l'augmentation de ces derniers indices correspond à une plus forte proportion d'acides gras à bas poids moléculaire pour un même poids de graisse ; simultanément la proportion des acides insaturés, généralement de haut poids moléculaire diminue en même temps que l'indice d'iode.

Toutefois, il peut arriver que les variations de l'indice d'iode et des indices de saponification et d'acidité volatile soient parallèles comme ceci s'est produit à Poligny en mars-avril 53 ou mai 54 et plus nettement à Jouy-en-Josas au printemps 54 : l'indice de saponification s'élève alors en même temps que l'indice d'iode. Il est possible que des acides insaturés autres que l'acide oléique, en particulier les acides à doubles liaisons conjuguées existent alors dans le lait en plus grande quantité : l'indice d'iode s'élève ainsi sans que soit affecté de façon sensible le poids moléculaire moyen des acides gras : cette augmentation de l'indice d'iode peut subsister même si l'indice de saponification s'élève légèrement. C'est précisément au printemps que MATTSSON (21) signale une proportion maxima d'acides gras à doubles liaisons conjuguées. LEMBKE et KAUFMANN (22) le confirment et indiquent que la proportion des acides triénoïques augmente également de l'hiver à l'été.

D. — RELATION ENTRE LA COMPOSITION ET LE POINT DE FUSION DE LA MATIÈRE GRASSE

Nous avons vu que ECKLES et SHAW (6) attribuaient plutôt aux variations de l'acidité volatile qu'à celles du contenu oléique, les modifications du point de fusion.

Nos résultats confirment cette observation. En effet, lors du vêlage de 1954, le point de fusion de la matière grasse du lait du 1er prélèvement d'Eglantine, est supérieur au témoin de 7,5 unités, alors que les acidités volatiles soluble et insoluble, sont respectivement inférieures au témoin de 9,9 et 1,4 unités. Le même phénomène se retrouve dans le cas d'Alcippe lors du vêlage de 1954.

Cependant le point de fusion de la matière grasse du 1er prélèvement (en 1953) du lait de Baby est bas (21). L'écart des indices par rapport au lait témoin est de — 2,7 pour l'indice de saponification, + 0,5 et — 1,2 pour les acidités volatiles soluble et insoluble. Mais l'indice d'iode atteint 50,1 soit 6,9 unités de plus que l'indice d'iode du témoin. Il se peut que cet indice d'iode exceptionnellement élevé impose la valeur du point de fusion.

En fin de lactation, le point de fusion semble s'élever. A cette même période, l'indice d'iode atteint des valeurs supérieures à celles du témoin. Mais la baisse des acides volatils est par contre très accentuée.

D'après DOLBY (23) il existerait une relation linéaire entre le point de fusion et la consistance du beurre ainsi qu'entre celle-ci et l'indice

d'iode, le beurre étant d'autant plus mou que l'indice d'iode est plus élevé. En Nouvelle-Zélande cependant, HANSEN et SHORLAND (12) aboutissent à une conclusion inverse. Or, d'après les résultats obtenus à Jouy, il ne nous a pas été possible d'établir une quelconque relation entre le point de fusion et l'un des quatre indices étudiés. Nous pensons donc comme HANSEN et SHORLAND (12) que le point de fusion de la matière grasse dépendrait du mode de distribution des acides gras dans la molécule de glycéride.

Les variations de composition de la matière grasse au cours de la lactation, moins importantes que celles dues aux changements saisoniers de régime alimentaire et de mode de vie du cheptel bovin, ne doivent toutefois pas être négligées.

Pour améliorer les fabrications beurrières et même fromagères, ou tout au moins pour éviter des accidents à certaines périodes de l'année, il serait souhaitable que les laits de fin de lactation se trouvent en minorité toute l'année.

Cependant si à ce point de vue, l'étalement des vêlages constitue une mesure intéressante, il est possible que, dans certaines régions, d'autres considérations conduisent à une orientation différente.

RÉSUMÉ

L'influence du stade de lactation sur la composition de la matière grasse du lait de vache a été étudiée en comparant les variations des indices d'iode, de saponification et d'acidité volatile du lait de mélange du troupeau de Jouy-en-Josas et de laits individuels.

La composition de la matière grasse du lait subit d'importantes modifications pendant les premiers jours de la lactation : augmentation de l'acidité volatile et de l'indice de saponification, diminution de l'indice d'iode.

Vers le 2e ou 3e mois de lactation les variations se font en sens inverse et les indices s'éloignent nettement de la valeur moyenne à la fin de la lactation : l'indice d'iode des laits individuels est alors nettement plus élevé que celui du lait témoin et les indices de saponification et d'acidité volatile sont très inférieurs.

Nous remercions Mlle BEJAMBES et M. MOCQUOT de nous avoir permis de poursuivre cette étude pour laquelle ils nous ont apporté de nombreux conseils et suggestions.

Nous remercions également M. POLY de nous avoir aider à interpréter les résultats concernant le stade de lactation.

Nous sommes reconnaissante envers MM. BLANC-PATIN et DUPIN qui ont effectué les prélèvements de lait à Poligny et à Jouy.

Références bibliographiques

(1) Bejambes (M.) et Savoie (S.). — Étude comparée des variations saisonnières de l'indice d'iode des beurres, en Normandie et en Alsace, *Chimie et Industrie*, **71,** (3), 501-506, 1954.

(2) Klein (J.) et Kirsten (A.). — Untersuchung über die chemische zusammensetsung des Milchfettes einzeiner kühe von verschiedenem Alter im Laufe einer Laktation, *Milch Zeitung*, **31,** (37) 577-578 ; (38) 594-596 ; (39) 611-613 ; Leipsig 1902.

(3) Swaving (A. J.). — Sättingugszahlen für die flüchtigen Fettsaüren der niederländischen Buttersorten. *Die Landwirtschaftlichen Versuch-Stationen*, **39,** 127-141, Berlin 1891.

(4) Schrodt (M.) et Henzold (O.). — Untersuchungen von Butterfett, *Die Landwirtschaftlichen Versuchstationen*, **38,** 349-371, Berlin 1891.

(5) Hunziker (Otto F.). — The moisture content of butter and the factors which control its variations, *Indiana Agricultural Experiment Station*, Twenty first Annual Report (1908), p. 62-63, Lafayette, 1900.

(6) Eckles (C. H.) et Shaw (R. H.). — The influence of the stage of lactation on the composition and properties of milk. U. S. Department of Agriculture. *Bureau of Animal Husbandry*, 1913, Bulletin nº 156.

(7) M. M. Taha el Katib. — Relation of stage of lactation to volatile and unsaturated fatty acids of Egyptian cow and Buffalo butterfat, *Indian Journal of Dairy Science*, **7,** (2), 101, 1954.

(8) New York Agricultural Experiment Station. Ninth, Tenth, Eleventh, Twelth and Thirteenth Annual Reports, Genova 1890-1894.

(9) Bulletin 111. Bureau of Animal Industry, United States Department of Agriculture.

(10) Schellenberger (O.). — Ueber die grosse und die Zahl der Fettkügelchen in der Milch von Küche verschiedener Rassen. *Milch Zeitung*, **22** (50), 817-819, 1893.

(11) Bartley (E. E.), Zaietel (J. H.), Bird (E. W.), Cannon (C. Y.), Wise (G. H.) and Kempthorne (O.). — The relationship of stage of lactation, pasturage and environmental temperature of the degree of insaturation of cow milk fat, *Journal of Dairy Science*, **34** (6), 536, 1951.

(12) Hansen (R. P.) et Shorland (F. B.). — Seasonal variations in fatty acid composition of New Zealand butterfat, *The biochemical journal*, **52,** 207-216, 1952.

(13) Letard (E.) et Thieulin (G.). — Influence de l'alimentation du bétail sur la production beurrière, *Annales de la Nutrition et de l'Alimentation*, **3** (3-4), 275-289, 1949.

(14) Hilditch (T. P.). — Chemical constitution of natural fats, Chapman and Hall, Ltd-London 1947, 14 *a* p. 115 ; 14 *b* p. 116.

(15) Frye (J. B.), Cannon (C. Y.) et Bird (E. W.). — The relationships among cracked soybeans fed, barn temperature and the degree of unsaturation of milk fat, *Journal of Dairy Science*, **23,** 257-266, 1950.

(16) Regan (W. M.) et Richardson (G. A.). — Reactions of the dairy cow to changes in environmental temperature, *Journal of Dairy Science*, **21,** 73-79, 1938.

(18) Grossfeld (J.). — Handbuch der Lebens mittel Chemie, IV Band : Fette und Oele Verlag von Julius Springer, Berlin 1939.

(19) Bruno (A.). — Beurres et graisses animales, Ed. Librairie polytechnique, Ch. Béranger, Liège, 19 *a* : p. 48 ; 19 *b* : p. 44.

(20) Pojak, French, Hunter, Martin. — Mode of formation of milk fatty acids from acetate in the goat, *Biochemical journal*, **48** (5), 612-618, 1951.

(21) MATTSSON (S.). — Poly-unsatured fatty acids in butter and their influence on the oxidation of butter. Methods of analysis and preliminary results, 12e Congrès Intern. Laiterie, Stockholm 2, 308.
(22) LEMBKE (A.), KAUFMANN (W.). — The content of conjugated fatty acids in milk fat, *Milchwissenschaft*, **9** (4), 113-114, 1954.
(23) DOLBY (R. M.). — The properties of New Zealand butters and butterfats. II. The relation of hardness of New Zealand commercial butter to composition of the butterfat, *The Journal of Dairy Research*, **16**, 336-348, 1949.

RECHERCHES SUR LES TECHNIQUES DE MESURE DU POTENTIEL D'OXYDO-RÉDUCTION DANS LES JUS DE RAISIN ET LES VINS

DÉTERMINATION DE CE POTENTIEL DANS QUELQUES JUS DE RAISIN ET QUELQUES VINS

PAR

Léonce DEIBNER
avec la collaboration technique de **Jules Mary**
Station Centrale de Recherches sur l'Œnologie, la Cidrerie et les Jus de Fruits, Narbonne.

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Introduction.

II. — Rappel des travaux antérieurs.

III. — Travaux personnels.

A) Électrodes de platine, leur préparation, leur vérification.
B) Agencement des récipients à électrodes.
C) Influence du barbotage du gaz inerte.
D) Influence du renouvellement du vin sur les mesures du potentiel.
E) Influence de l'air.
F) Durée des mesures du potentiel.
G) Influence du mode de protection contre l'action de l'oxygène de l'air.
H) Influence de la pression du gaz et de la température.
I) Expression des résultats.

IV. — Exposé de la techniqne des mesures du potentiel d'oxydo-réduction dans les jus de raisin et dans les vins.

A) Description de l'appareillage et des différents dispositifs employés au cours des mesures potentiométriques.
B) Détermination du potentiel d'oxydo-réduction dans les jus de raisin.
C) Détermination du potentiel d'oxydo-réduction dans les vins.

V. — Potentiel d'oxydo-réduction des jus de raisin et des vins.

A) Potentiels d'oxydo-réduction des jus de raisin.
B) Potentiels d'oxydo-réduction des vins.

VI. — Conclusion.

I. — INTRODUCTION

L'utilité de la connaissance du potentiel d'oxydo-réduction des jus de raisin et des vins a été évoquée à plusieurs reprises dans différentes publications ; cette circonstance nous dispense d'un nouveau plaidoyer en sa faveur.

Par contre, les règles pratiques de détermination de ce potentiel constituent, à notre avis, un problème quelque peu délaissé ou, tout au moins, insuffisamment développé.

Or, l'interprétation théorique et pratique des données potentiométriques s'avère valable à condition de disposer de techniques garantissant l'obtention de résultats corrects.

Le présent mémoire expose l'essentiel des conclusions des recherches effectuées concernant les dispositifs et les techniques des mesures du potentiel d'oxydo-réduction dans les jus de raisin et les vins. En outre, un certain nombre de potentiels de ces liquides, déterminés à l'abri de l'air dans des conditions bien définies, se trouve rassemblé dans la seconde partie de la publication.

II. — RAPPEL DES TRAVAUX ANTÉRIEURS

En raison des circonstances indépendantes de notre volonté nos publications précédentes, parues en 1950-1953 (1), n'ont pas fait état des travaux de certains auteurs et, en particulier, de DRBOGLAV (2 *a*) et de RODOPOULO (2 *b*). Ces chercheurs utilisent des récipients cylindriques obturés dans leurs parties supérieures à l'aide de bouchons traversés par des tubes d'amenée et de départ du vin et par les électrodes ; d'ailleurs, le dispositif de RODOPOULO possède deux électrodes de platine soudées sur les parois opposées.

A son tour, OSSIPOV (3) a proposé un appareil très simple, mais exigeant un volume plus grand de vin surtout pour le lavage du récipient.

RENTSCHLER et TANNER (4) ont décrit, d'une part, l'emploi d'un dispositif commercial pour mesurer le potentiel d'une prise d'essai de vin et, d'autre part, les électrodes de platine et au calomel spéciales permettent les déterminations potentiométriques dans les vins logés dans les fûts.

ALMEIDA (5) utilise pour les mesures du potentiel un récipient à électrodes accompagnant le potentiomètre commercial utilisé.

Par contre, MARECA CORTÈS (6) a mis au point un récipient ingénieux à rodages, constitué par trois parties facilement démontables.

III. — TRAVAUX PERSONNELS

Le problème de la mesure correcte du potentiel d'oxydo-réduction des vins, auquel nous nous sommes attachés depuis bientôt cinq ans, comprend un certain nombre de points particuliers. En premier lieu, il importe de disposer d'électrodes de platine susceptibles d'indiquer rapidement les valeurs reproductibles du potentiel d'oxydo-réduction ; leur préparation et leur nettoyage constituent une manipulation essentielles,

Le mode de jonction liquide entre les deux compartiments de la pile joue aussi un rôle important. La circulation du vin, la mesure de son potentiel devant se faire à l'abri de l'air, l'agencement du récipient à électrodes, le choix du gaz inerte imposent à leur tour certaines servitudes.

Dans le passé nous avons essayé d'apporter à l'appareillage, habituellement employé, quelques améliorations (*op. cit.* (1 *a*) ; toutefois, l'inaccessibilité des électrodes de platine constitue un inconvénient majeur de la pipette-électrode imaginée et réalisée par GARINO-CANINA (7). Il est regrettable que les publications françaises de l'époque n'aient pas mentionné la priorité de ce savant.

Déjà la mise au point d'un vase à électrodes décrit en 1953 marque notre désir de rompre avec le conformisme établi.

Ensuite nous avons entrepris d'autres recherches, destinées à perfectionner les dispositifs et à établir le mode opératoire rationnel lors de la détermination du potentiel du vin.

Les enseignements acquis seront exposés successivement dans ce qui suit.

A. — ÉLECTRODES DE PLATINE, LEUR PRÉPARATION, LEUR VÉRIFICATION

Avant toute mesure les fils des électrodes de platine doivent être soigneusement nettoyés. Les procédés du nettoyage sont variables. HEWITT (8) conseille d'immerger les électrodes dans l'acide nitrique chaud. D'autres techniques conseillent, après lavage à l'eau régale chlorhydrique ou à l'acide chlorhydrique, de chauffer le fil de platine au rouge dans la partie éclairante de la veilleuse d'un bec BUNSEN (9) ou le flamber au moyen d'une lampe à alcool éthylique pur ; en effet, un flambage au bec BUNSEN présente des inconvénients en raison de l'existence dans le gaz d'éclairage de produits sulfurés susceptibles d'empoisonner le platine.

D'autre part, le chauffage peut provoquer des félures dans la gaine en verre, ce qui détermine des résultats irréguliers au cours des mesures potentiométriques.

Après une série d'essais nous avons établi un procéde plus efficace et sûr pour effectuer le nettoyage des électrodes de platine.

Notre technique comprend quatre opérations distinctes : les trois premières sont les traitements par l'eau oxygénée à 110 volumes, ensuite successivement par les acides azotique et chlorhydrique concentrés ; la dernière est constituée par le lavage prolongé à l'aide de l'eau courante.

Après chaque mesure on rince les électrodes avec de l'eau, on les essuie avec du papier Joseph et on les plonge dans le perhydrol Electra (Prolabo) à 110 volumes pendant 15 mn ; on sait que l'eau oxygénée est décomposée par le platine ; les bulles d'oxygène libéré couvrent les fils de platine des électrodes et oxydent les impuretés organiques s'y trouvant. Consécutivement les deux traitements acides s'effectuent pendant 15 mn chacun. Après chaque traitement à l'eau oxygénée, aux acides, les électrodes sont abondamment rincées avec de l'eau courante, ensuite essuyées avec du papier Joseph. Le traitement à l'acide chlorhydrique est suivi d'un lavage à l'eau courante pendant 2-3 h. A cet effet, nous employons un récipient florentin cylindrique en faisant arriver l'eau du robinet par le col de cygne. Pour enlever les sels de l'eau courante on plonge les électrodes dans l'eau distillée en ayant soin de la changer trois fois.

Entre les mesures on maintient les électrodes dans l'eau distillée fréquemment renouvelée.

Cette manière d'opérer nous a donné satisfaction. Pour la vérification de notre potentiomètre et de nos électrodes de platine nous avons employé et nous employons la solution oxydo-réductrice de MICHAELIS (10), recommandée par BAYLET (11) ; cette solution contient par litre du :

— ferrocyanure de potassium K_3FeCy_6 — 0,001 M
— ferrocyanure de potassium K_4FeCy_6-$3H_2O$ — 0,001 M
— chlorure de potassium..... 0,002 M

Son potentiel de 406 mV à + 20°C est obtenu en absence de quinhydrone.

Dans les conditions habituelles du nettoyage des électrodes par l'acide azotique concentré, les valeurs du potentiel, lors de l'emploi de la solution de MICHAELIS, étaient variables puisque les électrodes conservaient plus facilement le « souvenir » des mesures précédentes. Actuellement notre technique de traitement des électrodes nous permet d'obtenir le potentiel réglementaire, de + 406 à + 20° par rapport à l'électrode normale d'hydrogène, soit au bout de quelques minutes, soit dans une demi-heure suivant la pureté du platine, utilisé pour la confection des électrodes.

La reproductibilité des résultats a été parfaite malgré les conditions sévères des essais de contrôle, à savoir : le traitement à l'eau oxygénée et aux acides, mesure du potentiel dans la solution de MICHAELIS, séjour dans le vin rouge, après le rinçage préalable avec de l'eau distillée, un

autre traitement suivi, comme d'habitude, d'un lavage à l'eau courante, enfin, une nouvelle mesure dans la même solution.

La vérification des électrodes peut également se faire à l'aide d'une solution-tampon VEIBEL, en présence de quinhydrone (E_H + 584,7 à 20°C) (12) ou au moyen du tampon de SÖRENSEN de pH3, obtenu par mélange d'acide chlorhydrique et de citrate de sodium ; son potentiel est de + 430 mV à 20°C, toujours par rapport à l'électrode d'hydrogène normal.

RENTSCHLER et TANNER (*op. cit.* (4) p. 296-297) utilisent le tampon de MICHAELIS (pH 4,62 à 18°C) et indiquent le procédé de contrôle des électrodes de platine et au calomel.

D'après NEKRASSOV (13), lors des mesures du potentiel dans les systèmes lents, il est indispensable d'utiliser des électrodes dégazées.

PALACIOS et VECINO conseillent le nettoyage électrolytique des électrodes de platine (14). La proposition est basée sur le fait que le platine absorbe les cations qui se transforment en atomes métalliques ou en oxydes, si l'oxygène est présent et si les métaux sont oxydables. On effectue l'électrolyse en milieu aqueux sous le courant continu de 220 volts et de quelques milliampères, pendant 24 h. Les électrodes de platine agissent comme des anodes ; les cathodes sont des barres de carbone. Après le traitement électrolytique, les électrodes sont immergées dans l'acide dilué, lavées avec de l'eau distillée et de nouveau traitées électrolytiquement, pendant quelques minutes.

Nous reviendrons ultérieurement aux conclusions intéressantes de PALACIOS et VECINO sur le rôle de la phase gazeuse au cours des mesures potentiométriques. Ces auteurs conseillent de conserver les électrodes dans la solution de chlorure de potassium saturée. RENTSCHLER et TANNER (*op. cit.* (4)) préconisent la conservation des électrodes au calomel dans cette dernière solution, et les électrodes de platine dans l'eau distillée. Habituellement les électrodes de ces types sont conservées dans l'eau distillée.

Bien entendu, la préparation et la conservation des électrodes amovibles se font sans difficulté.

De telles électrodes, munies de leurs rodages, peuvent avoir les fils en platine en forme de boudin ou de petites tiges. L'expérience nous a démontré que les fils droits terminés par une boule sont plus commodes surtout au cours de la mesure du potentiel des jus de raisin, contenant en suspension des particules organiques ; ces dernières se déposent plus facilement sur les spires en provoquant les modifications de potentiel.

Nous donnerons ultérieurement la description des électrodes de platine utilisées au cours de nos recherches.

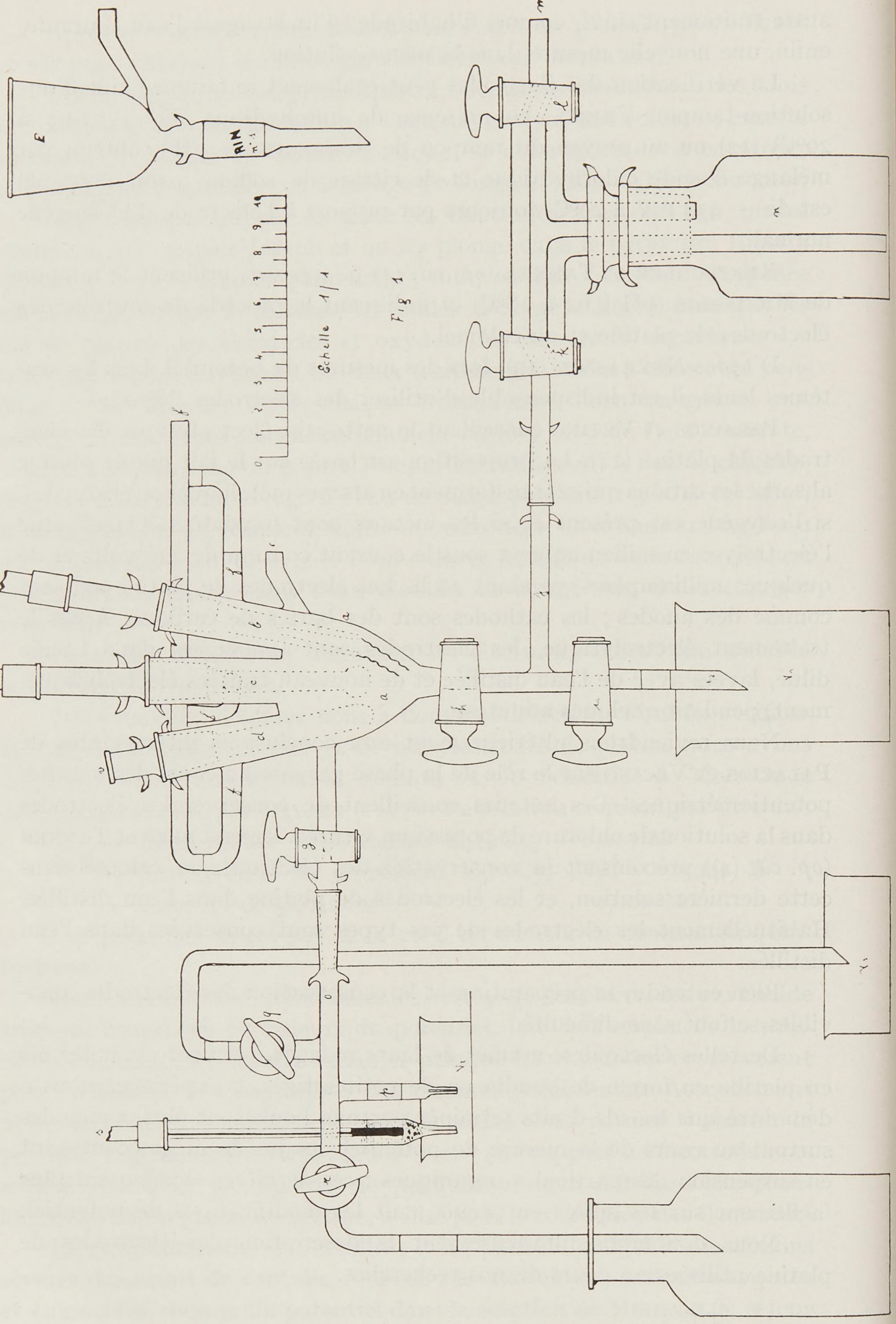


FIGURE I

B. — AGENCEMENT DES RÉCIPIENTS A ÉLECTRODES

a) Description des récipients à électrodes utilisés

Il y a un intérêt pratique, surtout au cours de l'étude de la maturation, à utiliser pendant les mesures du potentiel un volume restreint de vin, 15-20 ml, ce qui permet de réduire le volume total nécessaire à 90-100 ml, compte tenu des lavages préalables. Dans ces conditions la capacité utile du récipient à électrodes ne doit pas dépasser 40-45 ml. Lors des mesures du potentiel dans les jus de raisin, surtout en fonction de l'évolution végétative des baies de raisin, ce volume constitue le maximum possible puisque dans ce cas les lavages ou les renouvellements de liquide n'ont pas lieu.

Dans ces conditions notre vase à électrodes précédemment décrit (*op. cit.* (1 *b*)) ne convenait pas en raison de ses dimensions. Nous avons donc fait construire des récipients plus petits. Au début de nos recherches le dispositif utilisé comportait, d'une part, trois goulots, munis chacun d'un tube d'évacuation du gaz inerte, et, d'autre part, une conduite d'arrivée de ce dernier. La figure 1 donne l'idée de ce récipient, qui constitue la combinaison des deux dispositifs mis au point en 1950 et en 1953 (*op. cit.* (1 *a*, *b*)). Le récipient s'adapte au montage spécial décrit antérieurement (*op. cit.* (1 *b*)) et permettant le prélèvement du vin à l'abri de l'air.

Le flacon (*n*) à rodage (volume 150 ml) reçoit l'échantillon du vin, prélevé au moyen d'un siphon, à l'abri de l'air.

Les goulots (*d*, *c*, *b*) servent à fixer le porte-thermomètre, l'électrode de verre et l'électrode au calomel. L'entonnoir (E) est utilisé pour faciliter l'écoulement du jus de raisin en provenance du pressoir spécial (15). Le robinet (*g*), le tube latéral (*o*), le tube vertical (*p*) muni d'un tube-fout à capillaire, contenant un fil d'amiante soudé, sont remplis du vin.

La jonction électrolytique entre les électrodes du vase (*a*) et l'électrode au calomel (*s*) se fait au moyen de la solution saturée de chlorure de potassium se trouvant dans le vase (V 2). Les robinets (*g*) et (*r*) permettent l'évacuation du liquide et des bulles d'air.

En se rapportant à nos précédentes publications mentionnées, il est aisé de comprendre le maniement de cet appareillage. Bien entendu, à la place du flacon (*n*) il est possible d'utiliser des bouteilles ordinaires suivant le schéma déjà donné (*op. cit.* (1 *b*)).

Nous avons effectué avec le récipient à électrodes un certain nombre d'essais qui nous ont amené à construire un autre dispositif ; ce dernier constitue une copie, à l'échelle réduite, du vase universel à électrodes mis au point en 1953 (*op. cit.* (1 *b*)). Les figures 2 et 2 *a* présentent ce dispositif suivant les coupes verticale et horizontale. Le vin arrive par

le tube J ; le tube recourbé H constitue un trop plein. Les cinq goulots comportent chacun un tube latéral ; ces tubes sont réunis à l'aide de tubes en T et de tubes en caoutchouc de manière à assurer l'arrivée du gaz inerte et son évacuation ou à l'aide d'une « couronne » en verre.

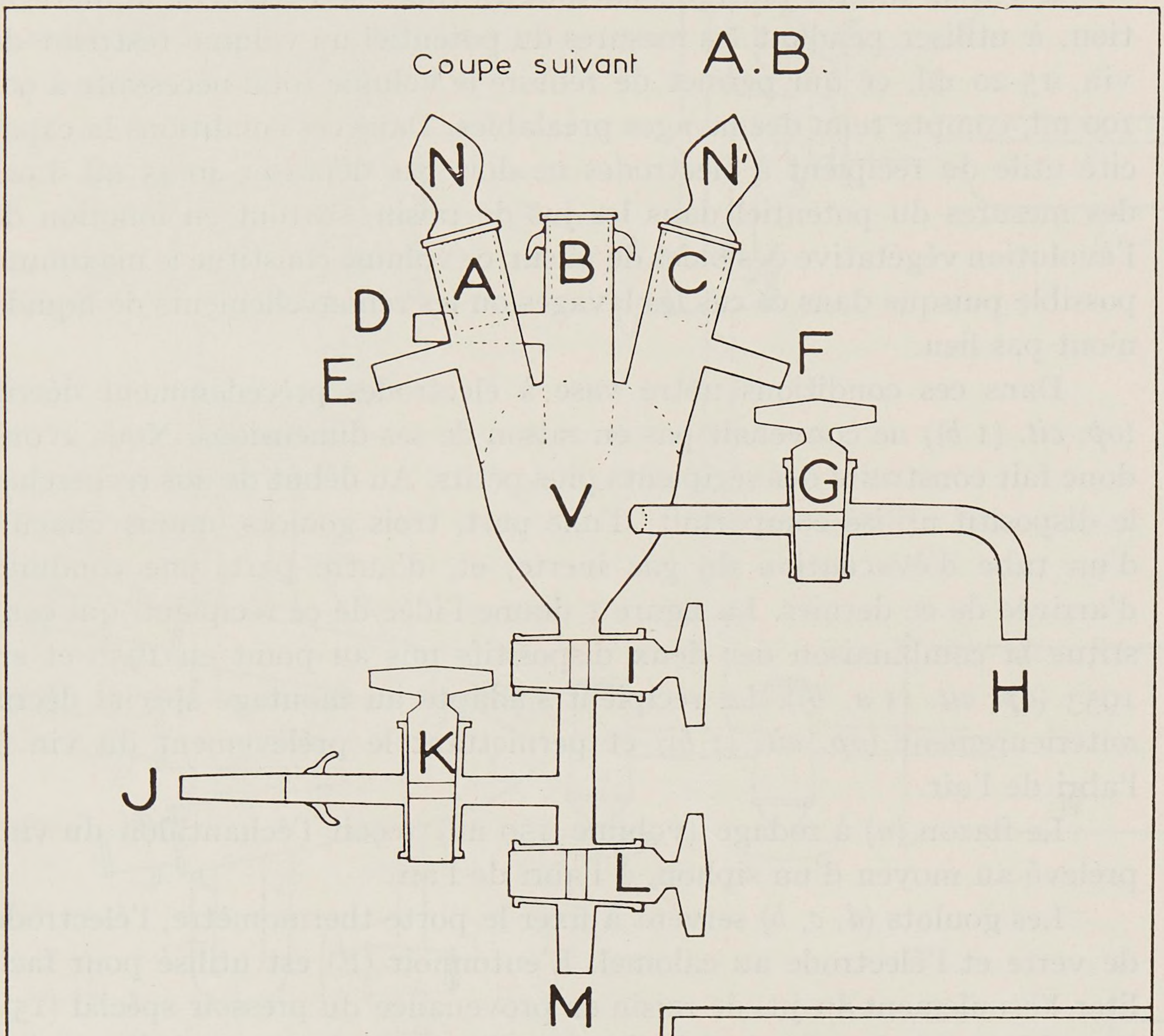


Fig. 2

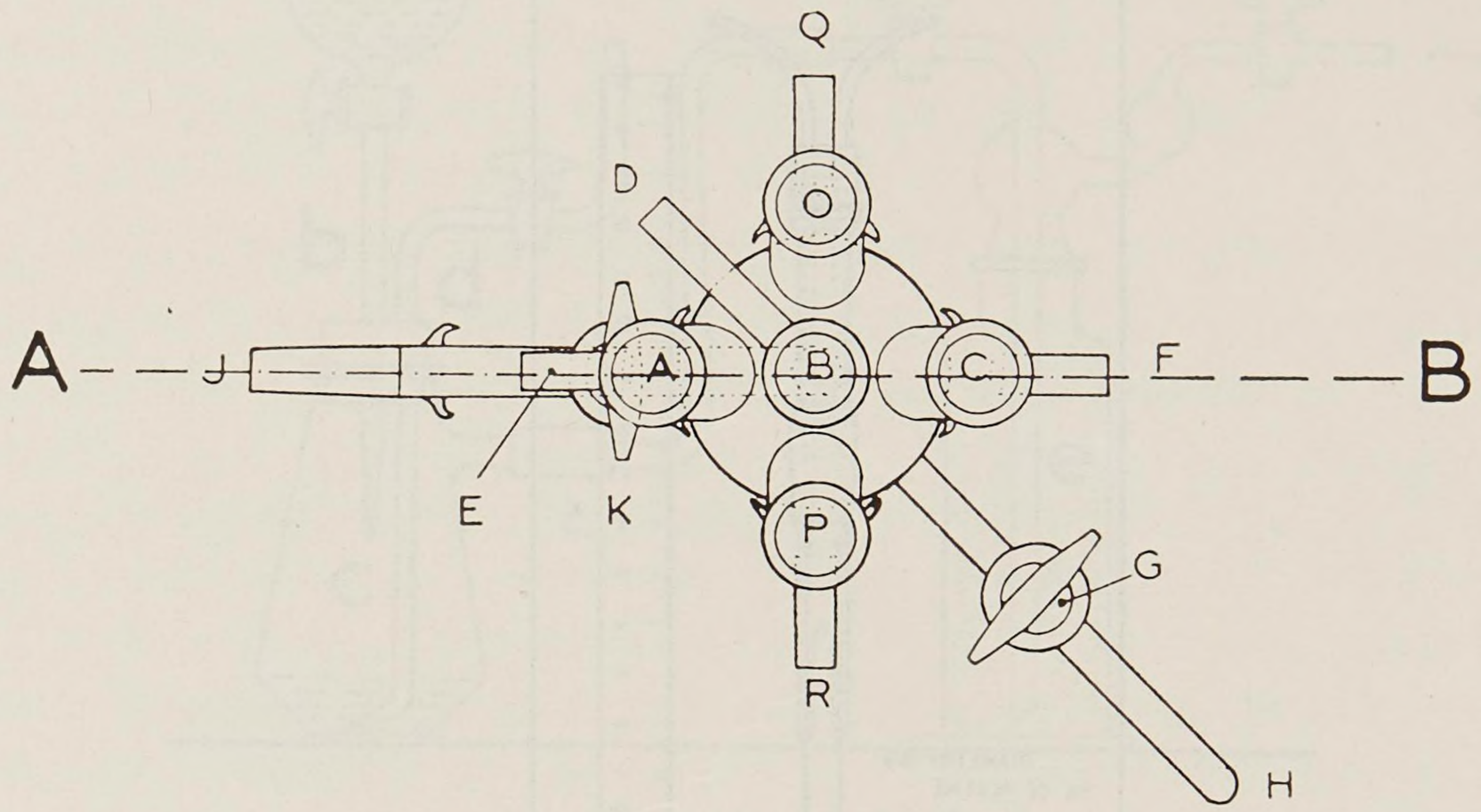
Les rodages A, B, C, O, P reçoivent les électrodes de verre, au calomel de platine ainsi que le thermomètre.

En supprimant l'électrode de verre, il est possible d'introduire dans le récipient 3 électrodes de platine doubles. A notre avis, il faut disposer au moins de 4 électrodes de platine simples pour être toujours sûr des résultats des mesures.

L'électrode de platine double est présentée sur la figure 3. Ces électrodes, fournies par les établissements J. QUÉRÉ à Bordeaux, nous ont donné toute satisfaction. Nous avons déjà indiqué que les électrodes sous

forme de boudin ne conviennent pas pour les mesures du potentiel dans les milieux hétérogènes tels que les jus de raisin en raison de l'existence des suspensions, donnant lieu aux dépôts sur les fils de platine.

La défectuosité de telles électrodes peut être décelée par les mesures du potentiel dans les tampons-étalons ; les défauts dans la soudure verre-platine sont faciles à constater en plongeant les électrodes dans le vin



Vase à électrodes

Figure 2 a

rouge ; ce dernier pénètre à l'intérieur de l'enveloppe en verre. Soulignons que la soudure du fil de platine au conducteur doit être faite bien au-dessus de la fourche.

La désaération du récipient à l'aide d'un gaz inerte — gaz carbonique, azote — est contrôlée à l'aide d'un dispositif indiqué sur la figure 4, Ce dispositif, décrit en détail dans un autre mémoire (*op. cit.* (15)), dérive de celui de KOULNEVITCH (16).

L'ampoule (*a*) contient 30 ml de solution 0,2 m de carbonate de sodium (56 g de Na_2CO_3. 10 H_2O par litre) ; on y dissout 300 mg d'hydrosulfite de sodium. D'autre part, 25 ml de solution de carbonate se trouvent

dans une petite fiole à vide ; on y additionne une pincée de carmin d'indigo. On fait passer le gaz, en provenance du récipient à électrodes, pendant quelques minutes ; ensuite on ajoute, goutte à goutte, à l'aide d'un tube capillaire (*b*), de l'hydrosulfite jusqu'au virage jaune, sans ajouter un excès de réactif.

Le verdissement ou le bleuissement de la solution de carmin d'indigo nécessite de nouvelles additions d'hydrosulfite. La désaération est complète, si la coloration jaune reste stable pendant 15 mn.

Ce procédé de la détection de l'oxygène de l'air, extrêmement sensible et élégant, facilite le contrôle de la désaération de l'appareillage au cours des mesures du potentiel d'oxydo-réduction.

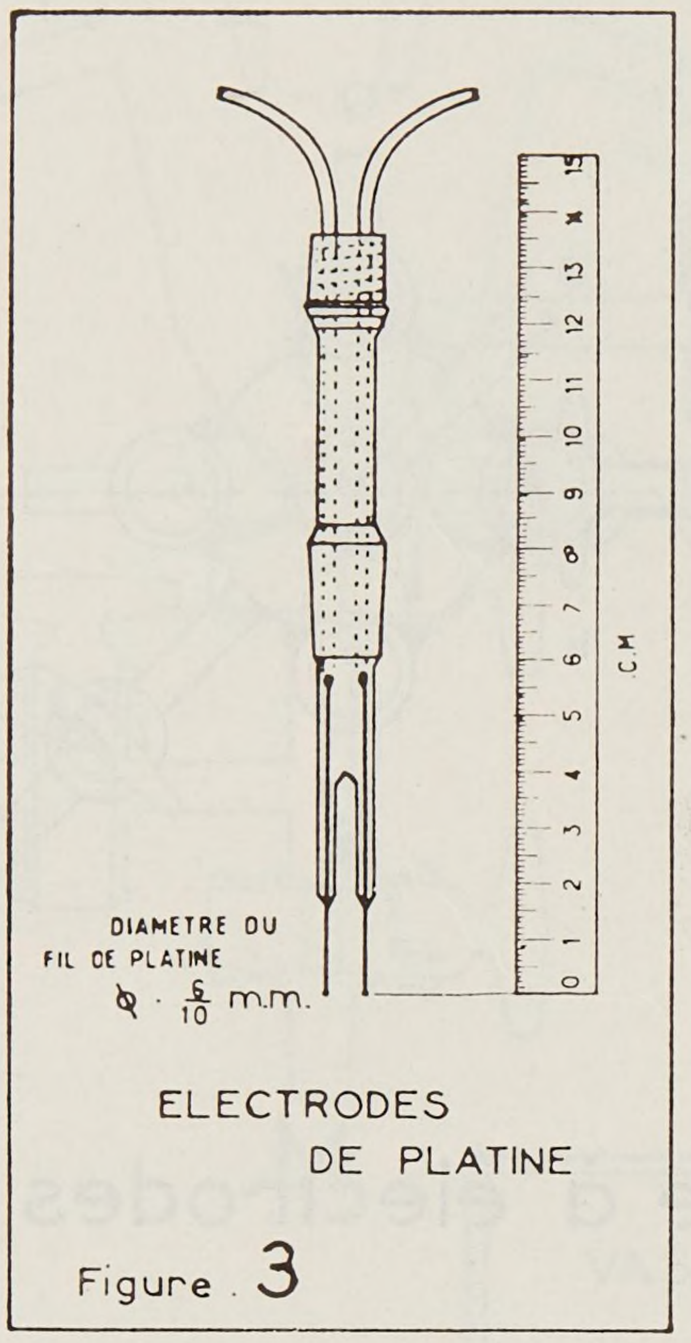


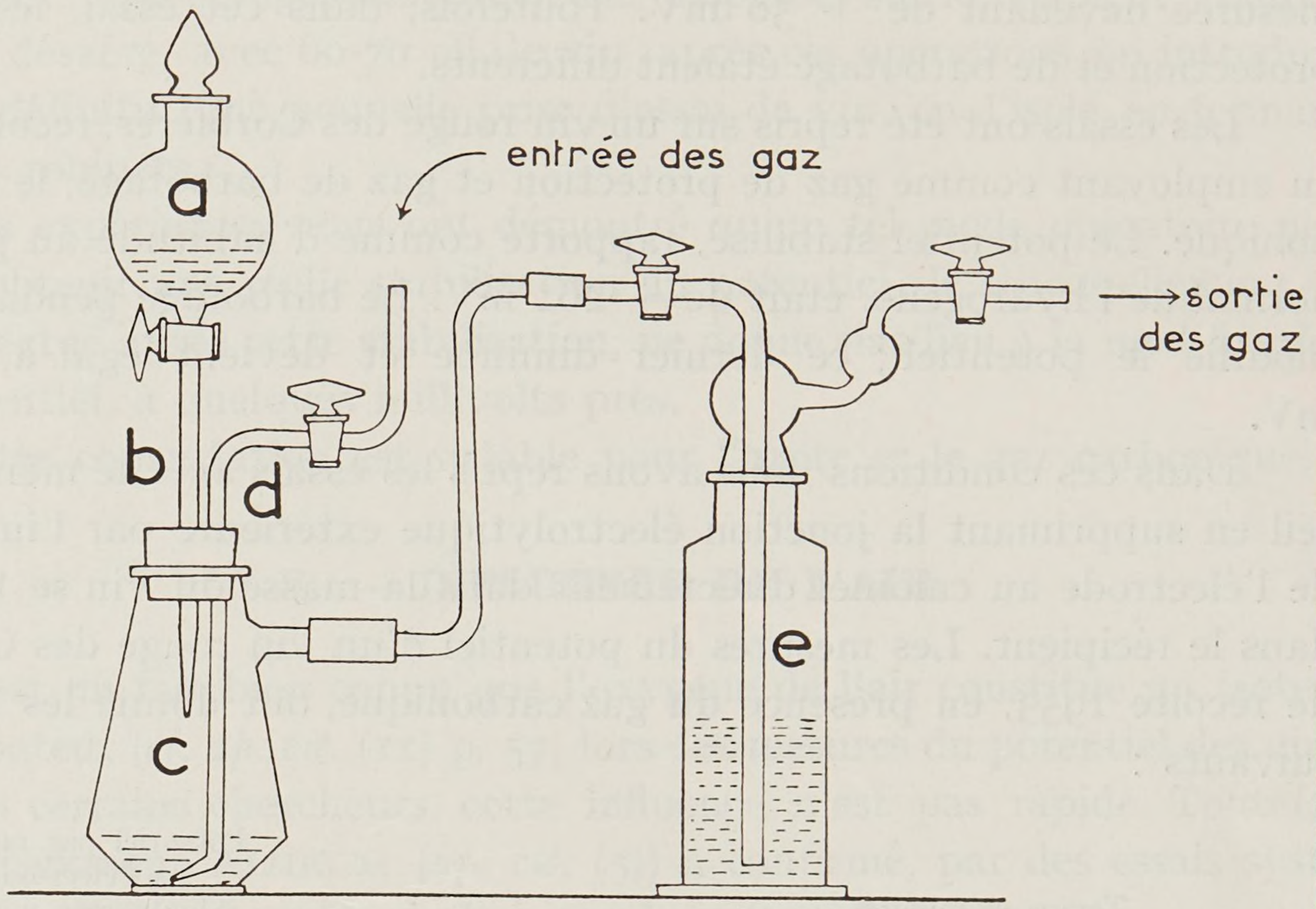
Figure . 3

b) Influence du mode de jonction électrolytique sur le potentiel

Comme nous l'avons vu, le récipient à électrodes, représenté par la figure 1, a l'inconvénient d'avoir la jonction électrolytique extérieure.

Les essais comparatifs, effectués avec un vin rouge des Corbières, montrent que ce mode de jonction influe sur le potentiel d'oxydo-réduction, en l'augmentant. Après avoir obtenu, au bout de deux heures, en présence de l'azote, la valeur stable du potentiel de + 238, nous avons disposé l'électrode au calomel, munie de son tube-pont sous forme d'un tube capillaire, contenant un fil d'amiante soudé, sur le goulot du récipient.

Au bout de 25 mn le potentiel stable était de + 220 mV. Par un simple déplacement de l'électrode la baisse du potentiel était de 18-20 mV sur la même prise de vin. Bien entendu, nous avons pris toutes les précautions pour éviter l'entrée accidentelle de l'air dans le vin.



DISPOSITIF POUR CONTRÔLE QUALITATIF
DE LA DÉSAÉRATION

Figure. 4

Cette constatation était suffisante pour proscrire l'emploi de la jonction électrolytique extérieure au récipient.

L'inconvénient de la jonction extérieure est encore plus évident quand on fait barboter du gaz inerte à travers le vin.

C. — INFLUENCE DU BARBOTAGE DU GAZ INERTE

En étudiant l'influence du gaz inerte dans le vin, après ou avant la stabilisation du potentiel du vin, nous avons fait quelques observations intéressantes.

Le potentiel d'un vin rouge des Corbières de la récolte 1952, mesuré en présence de l'azote, au bout de 70 mn, était de 203 mV, la mesure étant faite dans le récipient à jonction électrolytique extérieure. Remarquons que pendant les déterminations les robinets (*h*, *q*, *r*) sont fermés et le robinet (*g*) reste ouvert.

En effectuant le barbotage du gaz carbonique dans le vin pendant quelques minutes (le gaz arrive par le tube (*j*) et par le robinet (*h*) ouvert), nous avons constaté la diminution sensible du potentiel, la valeur mesurée devenant de + 50 mV. Toutefois, dans cet essai, les gaz de protection et de barbotage étaient différents.

Les essais ont été repris sur un vin rouge des Corbières, récolte 1953, en employant comme gaz de protection et gaz de barbotage, le gaz carbonique. Le potentiel stabilisé, rapporté comme d'habitude au potentiel normal de l'hydrogène, était de + 261 mV. Le barbotage pendant 2 mn modifie le potentiel ; ce dernier diminue et devient égal à + 188 mV.

Dans ces conditions nous avons repris les essais avec le même appareil en supprimant la jonction électrolytique extérieure par l'immersion de l'électrode au calomel directement dans la masse du vin se trouvant dans le récipient. Les mesures du potentiel d'un vin rouge des Corbières de récolte 1953, en présence du gaz carbonique, ont donné les résultats suivants :

Temps en minutes	Potentiel par rapport à l'électrode d'hydrogène normal
0	+ 170
60	+ 150
120	+ 110
130	+ 100
140	+ 100
Barbotage lent pendant 2 minutes	
10	+ 93
15	+ 90
20	+ 82
25	+ 82

On remarque que l'influence du barbotage est peu sensible et peut être attribuée au départ de l'oxygène dissous.

Sans doute le décalage du potentiel dans le cas de la jonction électrolytique extérieure s'explique par un déséquilibre provoqué par une saturation plus grande en gaz du liquide dans le récipient par rapport à sa portion emprisonnée dans le tube latéral (*o*) (voir la fig. 1).

Dans ces conditions nous avons abandonné la jonction électrolytique extérieure en rompant ainsi avec une pratique traditionnelle que l'on suivait par esprit de conformisme.

D. — INFLUENCE DU RENOUVELLEMENT DU VIN SUR LES MESURES DU POTENTIEL

La pratique traditionaliste conseille de renouveler le vin dans le récipient afin de hâter la stabilisation du potentiel. Ce procédé convient à condition de protéger effcacement le vin, contenu dans une bouteille, contre l'oxydation due à l'entrée accidentelle de l'air.

Nous préférons effiectuer, au commencement des mesures potentiométriques, trois lavages des électrodes, disposées sur le récipient, complètement désaéré, avec 60-70 ml de vin ; après ces opérations, on introduit, à titre définitif, une nouvelle prise d'essai de vin, on l'isole en fermant tous les robinets.

Les expériences nous ont démontré qu'un tel mode opératoire permet d'obtenir une réelle stabilisation du potentiel ; le renouvellement du vin, effectué après cette stabilisation, ne donne pas lieu à la modification du potentiel, à quelques millivolts près.

Cette constatation est valable pour l'azote et le gaz carbonique.

E. — INFLUENCE DE L'AIR

C'est un fait bien connu que l'oxygène de l'air constitue un facteur perturbateur (*cf. op. cit.* (11) p. 57) lors des mesures du potentiel des vins. D'après certains chercheurs, cette influence n'est pas rapide. Toutefois tout récemment ALMEIDA (*op. cit.* (5)) a confirmé, par des essais systématiques, l'action rapide de l'air sur le potentiel du vin.

Pour notre part, nous avons cherché à chiffrer cette influence après avoir obtenu la valeur du potentiel stabilisé. Les essais ont été faits avec un vin rouge du Minervois (Aude), récolte 1953. Une paire d'électrodes a été disposée dans la partie inférieure du récipient, deux autres se trouvaient plus près de la surface du vin. Dans la première expérience on a suivi le potentiel jusqu'à sa stabilisation en présence du gaz carbonique ; ensuite on débranchait le tube d'amenée du gaz et on abandonnait le vin dans le récipient à électrodes en laissant, en même temps pénétrer l'air par les orifices d'amenée et de sortie du gaz de protection ; on mesurait le potentiel en fonction du temps. Voici les résultats obtenus :

Temps minutes	Potentiel E_H — Electrodes du fond		Electrodes disposées plus haut			
	A) Mesures en présence du gaz carbonique					
0	+ 138	+ 125	+ 153	+ 167	+ 212	+ 205
60	192	185	192	196	208	208
75	196	190	194	195	205	205
90	195	190	195	190	207	207
	B) Mesures en présence de l'air					
100	+ 195	+ 190	+ 202	+ 204	+ 247	+ 247
105	195	190	225	225	256	256

Les résultats obtenus confirment la nécessité de surveiller constamment la plus parfaite protection du vin de l'influence de l'oxygène de l'air. D'ailleurs, le décalage sensible entre les indications des électrodes, disposées dans les niveaux bien différents dans le vin, pourrait servir de guide pour déceler les fuites.

Les résultats des tableaux nous montrent en même temps qu'au commencement des mesures le potentiel peut être plus bas que sa valeur à la stabilisation, au lieu d'être plus élevé. L'état des électrodes est responsable de ces variations. C'est pour cette raison que la durée de la stabilisation du potentiel dépend de l'état d'oxydation ou de réduction des électrodes de platine par rapport au vin. Dans ces conditions les premières mesures ne peuvent pas être retenues comme définitives.

F. — DURÉE DES MESURES DU POTENTIEL

Comme on le sait, le potentiel d'oxydo-réduction des vins et des jus de raisin ne s'établit pas très rapidement ; d'autre part, la mesure du potentiel d'un vin aéré est aisée tandis que cette mesure est plus difficile dans les vins conservés à l'abri de l'air (17) (18).

En principe les mesures doivent être considérées comme terminées, si les valeurs du potentiel, données par chaque électrode, ne diffèrent pas de 2,5 mV-5 mV par rapport à la valeur notée précédemment ; on sait que les mesures sont faites toutes les 10-15 mn et qu'il faut utiliser à la fois 2-3 électrodes au minimum.

Cette nécessité d'obtenir la valeur stable du potentiel est interprétée différemment. Wurmser a montré en 1930 que pour les solutions des glucides le potentiel de l'équilibre est atteint en 2 h à 20 mV près (19). Ribéreau-Gayon (*op. cit.* (17)) précise que la stabilisation exige parfois un délai de 45 mn et davantage.

Joslyn (20), Almeida (*op. cit.* (5)), Frolov-Bagreev et Agabaliantz (21) attendent la stabilisation complète du potentiel.

Mme Saénko (22 a) effectue les mesures toutes les 5-10 mn jusqu'à l'obtention de la valeur stable.

Par contre, Baylet (*op. cit.* (11) p. 46) effectue trois mesures à quelques minutes d'intervalle. Drboglav (*op. cit.* (2)) note le potentiel quatre fois, toutes les 5 mn, et prend la moyenne des 3 dernières mesures. Rentschler et Tanner (*op. cit.* (4)) exécutent les mesures toutes les 20 sec. pendant 2-20 mn. Enfin Politova-Sovzenko (22 b) propose de prendre, comme valeur définitive du potentiel, celle mesurée dans 10 mn après le lavage et le remplissage du récipient à électrodes.

A notre avis, tous les procédés basés sur l'acceptation, comme potentiel définitif, de la valeur du potentiel, obtenue soit au titre de la moyenne

de quelques premières mesures, soit à titre de la stabilisation apparente du potentiel au cours des mesures extrêmement serrées au point de vue de la durée sont beaucoup plus conventionnels par rapport à ceux préconisant la stabilisation du potentiel en fonction du temps.

Il est facile de démontrer que les premières mesures du potentiel accusent une différence plus ou moins grande suivant l'état d'oxydation ou de réduction des électrodes de platine par rapport à celui du vin.

En outre, les procédés rapides de la mesure du potentiel doivent normaliser leur mode opératoire, en précisant exactement le temps qui doit s'écouler entre le premier contact des électrodes de platine avec le vin ou le jus de raisin au cours de leur lavage et la première mesure. Même cette précaution n'est pas susceptible de neutraliser l'objection tout à l'heure indiquée.

Nous avons utilisé au cours de nos recherches le potentiomètre des Etablissements Quéré à Bordeaux donnant en lecture directe 10 mV et par approximation 5 mV et enfin 2,5 mV.

Nos mesures du potentiel se faisaient tous les 15 ou 10 mn au début et à la fin des expériences, en portant ce délai à 30 mn entre ces deux limites, surtout si la durée totale des essais était plus longue, comme c'est le cas pour les jus de raisin.

Pour ces dernières, le temps nécessaire pour que la vitesse de chute du potentiel $\frac{\Delta mV}{T}$ soit devenue égale à environ 0,2 mV par minute, se situait, en général, entre 3 et 4 h. Pour les vins ce temps était variable suivant leur état d'oxydation, suivant le nombre des répétitions des mesures avec les vins du même type, faits bien connus et relatés par ailleurs (*op. cit.* (17)).

Voici d'abord les données numériques concernant les jus de raisin frais (voir le tableau I).

Les mesures ont été effectuées à l'aide de 6 électrodes de platine. Les potentiels, mesurés en présence de l'électrode au calomel saturé, étaient rapportés à l'électrode normale d'hydrogène.

Il ressort des résultats enregistrés que le potentiel définitif moyen est + 293 mV. En prenant la moyenne de tous les potentiels des 3 dernières mesures le potentiel est de + 295 mV. Au début le rapport $\frac{\Delta mV}{T}$ varie beaucoup. Rappelons que ΔmV est la différence entre deux valeurs du potentiel mesuré à l'intervalle de T minutes.

Pour la première électrode et pour la mesure n° 8 $\frac{\Delta mV}{T}$ est égal à $\frac{312-308}{15} = 0{,}26$ mV/mn. A partir de 10e mesure le rapport est de 0,2. Il a fallu pour cela 170 mn.

TABLEAU I

Jus de raisin du cépage de Carignan, pH 3,22 ; *t°* 20°,5, *gaz inerte employé Azote R (l'Air Liquide)*
(*Date* 5-X-1954)

N° des mesures°	Temps en minutes	Indication de différentes électrodes de platine					
1	0	+ 442	+ 432	+ 418	+ 418	+ 428	+ 445
2	15	395	388	372	378	387	390
3	30	370	362	350	355	358	362
4	60	345	340	323	328	332	332
5	90	328	322	308	312	316	312
6	120	315	312	300	312	302	304
7	135	312	310	295	302	302	303
8	150	308	305	293	295	292	290
9	160	304	302	290	292	295	293
10	170	302	300	290	292	293	293
11	180	300	299	289	290	290	280

Si l'on prenait comme potentiel définitif celui enregistré à la deuxième mesure, sa valeur moyenne serait de + 385 mV, c'est-à-dire supérieure à 100 mV à celle obtenue à la 11e mesure. La différence est sensible, ce qui condamne le procédé préconisant de considérer le résultat de la mesure au bout de 10 mn comme le potentiel définitif.

TABLEAU II

Vin rouge, pH 3,5, *t°* 20°5 ; *gaz inerte employé : Azote R*
(*Date* 3-XII-1954)

N° des mesures	Temps en minutes	Potentiels mesurés à l'aide des différentes électrodes de platine E_H mV							
1	0	+ 278	+ 283	+ 291	+ 290	+ 278	+ 288	+ 272	+ 270
2	15	228	228	240	238	228	228	217	217
3	30	208	208	212	212	209	208	202	207
4	60	203	198	198	198	200	200	200	202
5	75	197	197	197	197	196	198	200	200
6	90	202	199	199	197	198	200	200	204

Suivant l'état des jus de raisin et l'état des électrodes de platine, la différence entre les indications données par les différentes électrodes, peut être nulle, minime ou atteindre 20 mV par exemple.

Rappelons que les jus de raisin ont été obtenus à l'aide de notre pressoir à filtre (*op. cit.* (15)).

Parmi les nombreux essais effectués avec les vins, nous citerons le cas d'un vin rouge de la région de Narbonne, récolte 1952, conservé en bouteille.

On remarque que les deux premières mesures diffèrent très sensible-

ment. En prenant la moyenne de toutes les valeurs obtenues à la cinquième mesure, au bout de 75 mn, nous avons comme potentiel définitif moyen + 198 mV, rapporté à l'électrode normale d'hydrogène.

En opérant suivant notre procédé, la stabilisation pour les vins oxydés, c'est-à-dire caractérisés par des potentiels élevés, dépassant + 300 mV, peut être obtenue dans 30-45 mn tandis que pour les vins caractérisés par des potentiels inférieurs à + 250, la durée de la stabilisation dépasse souvent 60 mn et peut demander 1 h 30-2 h.

Ces constatations ont été obtenues à la suite de nombreux essais.

D'ailleurs, en 1949, KOTCHERGA (23) a démontré clairement la nécessité d'attendre l'établissement de la valeur fixe du potentiel et le rôle de l'état des électrodes de platine.

G. — INFLUENCE DU MODE DE PROTECTION CONTRE L'ACTION DE L'OXYGÈNE DE L'AIR

Les mesures du potentiel d'oxydo-réduction doivent se faire à l'abri de l'air, soit sous vide, soit sous gaz inerte.

Deux cas se présentent : les jus de raisin et les vins.

a) Jus de raisin

Les mesures du potentiel d'oxydo-réduction des jus de raisin à l'abri de l'air sont rares, tandis qu'il existe un certain nombre de déterminations modernes en présence de l'air.

1. — Mesures sous vide

JÖRGENSEN (24) a effectué la détermination du potentiel d'un jus de raisin obtenu en présence de l'air. La mesure sous vide a donné une valeur de + 418 mV pour 20°C et pour le pH égal à 3,94.

La stabilité du potentiel a été obtenue pour $\frac{\Delta m\text{V}}{\text{T}}$ égal à 0,1 mV pour 1 mn.

2. — Mesures en présence d'un gaz inerte

Pour notre part nous avons effectué les mesures du potentiel du jus de raisin en présence soit du gaz carbonique, soit de l'azote pur (qualité R., Sté L'Air Liquide). Les jus de raisin ont été également obtenus à l'abri de l'air, respectivement en présence de l'un ou de l'autre de ces gaz. La libération du jus s'effectuait au moyen de notre pressoir à filtre (*op. cit.* (15)).

Parmi les nombreuses expériences, utilisant successivement le gaz carbonique et l'azote pour le même jus, issu d'un lot de raisin connu,

nous avons choisi un exemple pour illustrer la différence des résultats obtenus en fonction de la nature du gaz.

Le jus de raisin de Terret Blanc, prélevé dans le vignoble le 13 octobre 1954, possédait les caractéristiques suivantes :

Sucre : 184 g/l

pH : 3,15

Les résultats des mesures sont consignées dans le tableau III.

Ce dernier reproduit la moyenne des valeurs données par 6 électrodes de platine.

Dans les deux cas, le poids de la prise d'essai, le nombre de grains, la température des mesures (+ 18°C), la durée des mesures (3 h 1/2) ont été identiques. Comme d'habitude, les potentiels sont rapportés à l'électrode normale d'hydrogène.

TABLEAU III

	En présence de : Gaz carbonique	Azote
Potentiel stabilisé en mV	+ 204	+ 336
Acidité totale en grammes de H_2SO_4 par litre	4,8	5,2

La baisse du potentiel en présence de gaz carbonique par rapport à celui obtenu en présence de l'azote est de 132 mV.

C'est pour cette raison que nous avons adopté l'emploi de l'azote pour toutes les mesures du potentiel dans les jus de raisin.

Cette différence plus ou moins prononcée de l'ordre de 70-130 mV a été retrouvée pour d'autres raisins conservés au frigorifique au cours de l'hiver. Le tableau IV résume les résultats obtenus avec un raisin blanc de type hybride indéterminé.

Au cours de ces essais nous avons observé l'influence du dépôt formé sur les spires des électrodes de platine. Les mesures marquées par (*b*)

TABLEAU IV

Prise d'essai 80 g *des baies ; volume du moût obtenu :* 20-25 *ml ; pression utilisée :* 5 *kg/cm³ ; température* + 19°C.
Le potentiel est rapporté à l'électrode normale d'hydrogène.

Durée des mesures minutes	Air libre			Azote-R			Gaz carbonique		
	pH	E_H mV		pH	E_H mV		pH	E_H mV	
0		+ 530	+ 450		+ 400	+ 420		+ 240	+ 235
40		+ 494	+ 498		+ 368	+ 374		+ 230	+ 225
50		+ 522	+ 538						
60		b) 500	498						
80		a) 505	560	3,65	+ 360	+ 362	3,7	+ 268	+ 270
		b) 554	552						
225	3,45	+ 608	+ 608						

ont été faites après avoir tourné les électrodes autour de leurs axes, leurs rodages étant maintenus dans les boisseaux ; lors des mesures marquées par (*a*) les électrodes n'ont pas été tournées.

Ces essais, ainsi que d'autres expériences, ont montré que le gaz carbonique n'influe pas sur le pH des jus de raisin.

b) **Vins**

Un certain nombre de mesures comparatives, en présence d'azote ou de gaz carbonique, ont été effectuées sur les vins de différentes provenances, conservés à l'abri de l'air ou aérés.

1° Un muscat de Tunisie de récolte 1949, conservé dans une bouteille couchée ; ce vin de liqueur constitue un type de mistelle.

2° Un vin rouge de Coursan (Aude), récolte 1952, conservé dans une bouteille couchée pendant 2 ans.

3° Un vin rouge de Ginestas (Aude), récolte 1953, conservé dans une bouteille tenue verticalement.

4° Un vin doux naturel rouge de Villeneuve-les-Corbières (Aude), récolte 1952, conservé d'abord en vidange, puis conservé dans une bouteille pleine et couchée pendant 3 j.

5° Un vin rouge de Minervois, Puichéric (Aude), récolte 1954, embouteillé en présence de l'air et conservé dans une bouteille couchée pendant 7 j.

Nous avons effectué les mesures potentiométriques en présence d'azote R et ensuite, sur la même bouteille, en présence du gaz carbonique. Dans ces conditions la durée des mesures, à l'aide de six électrodes de platine, en présence de ce dernier gaz, était plus courte en raison de l'accoutumance, bien connue des électrodes au vin expérimenté.

Les résultats des essais sont consignés dans le tableau V.

TABLEAU V

Durée des mesures en minutes ; potentiel par rapport à l'électrode normale d'hydrogène ; température de mesures + 18 — + 22°C

Nature du gaz	1 Muscat de Tunisie 1949			2 Rouge, Coursan 1952			3 Rouge, Ginestas 1953			4 Vin doux naturel rouge, Villeneuve des Corbières 1952			5 Rouge Minervois (Puichéric 1954)		
	pH	Durée	E_H mV	pH	Durée	E_H mV	pH	Durée	E_H mV	pH	Durée	E_H mV	pH	Durée	E_H mV
Azote R	4,10			3,5			3,38			3,18			3,39		
	—	75	+109	—	80	+198	—	75	+335	—	60	+439	—	70	+264
Gaz carbonique	—	45	+ 94	—	45	+183	—	30	+339	—	30	+445	—	80	+238

On constate facilement que l'influence du gaz carbonique n'est pas sensible pour les vins oxydés, caractérisés par des potentiels élevés (vins nº 3 et 4) ; elle est plus prononcée pour les jeunes (vin rouge du Minervois, nº 5), pour le vin rouge vieux de Coursan et enfin pour le Muscat de Tunisie. Toutefois, pour ce dernier la différence entre les valeurs obtenues en présence des deux gaz, n'est pas grande, si l'on tient compte que c'est un moût alcoolisé. Or, nous avons vu que cette différence est grande pour les moûts de raisin fraîchement obtenus.

Dans ces conditions on est tenté de supposer l'influence des traces d'oxygène contenues dans l'azote pur (Azote R). Toutefois, l'expérience montre que cette incrimination est sans fondement puisque on n'observe qu'un très léger virage du carmin d'indigo, à l'aide du dispositif du contrôle de désaération, déjà décrit, qu'au bout de 30 mn du passage très rapide du gaz.

Remarquons que le gaz carbonique, livré par les Glacières de LALANDE à Toulouse, est exempt d'oxygène.

Nous avons également cherché à abréger la durée des mesures en exécutant le barbotage du gaz carbonique dans le vin pendant 15 mn, avant toute mesure. Les essais comparatifs, avec et sans barbotage, n'ont pas donné des résultats intéressants.

c) Discussion des résultats obtenus

La différence des résultats des mesures potentiométriques, effectuées en présence d'azote ou de gaz carbonique, dans les jus de raisin ou les vins, est difficile à expliquer.

Pour les jus de raisin on est tenté de mettre la différence des potentiels sur le compte de leur équipement enzymatique. Toutefois, les preuves manquent.

D'après PALACIOS et VÉCINO (*op. cit.* (14)) la force électromotrice des piles galvaniques du type M/... Mn/ Pt. ne dépend pas de la pression du gaz employé ; les gaz (oxygène, hydrogène, gaz carbonique) ne peuvent pas entrer en réaction avec le producteur de la force électromotrice ; l'électrode de platine ne peut être considérée comme électrode à gaz.

Les auteurs cités admettent que le potentiel galvanique de l'électrode de platine est dû à l'adsorption des cations et que le nombre des cations adsorbés par l'unité de la surface dépend de la nature du gaz utilisé.

Nous citerons simplement les résultats obtenus par ces auteurs avec les piles mettant en présence l'électrode de platine et l'électrode au calomel.

1º Electrode au calomel/HCl normal/Platine

Gaz employé	H_2	O_2	Air	CO_2
Force électromotrice en mV	— 240	+ 484	+ 447	+ 239

2° Electrode au calomel/KCl saturé/Platine				
Gaz employé	H_2	O_2	Air	CO_2
Force électromotrice en mV ...	— 122	+ 183	+ 187	+ 183

Nous voyons que la fixation de l'ion hydrogène par l'électrode de platine dépend de la nature des gaz, tandis que dans le cas de l'ion potassium il n'existe aucune différence.

Nos essais comportaient l'emploi de l'azote et du gaz carbonique ; or, PALACIOS et VECINO n'ont pas expérimenté l'azote.

Néanmoins, on pouvait supposer qu'en présence du gaz carbonique les électrodes de platine fixent plus facilement certains corps des jus de raisin, qu'en présence de l'azote. D'autre part, l'influence des enzymes sur le potentiel d'oxydo-réduction des vins est encore inconnue (*cf. op. cit.* (21) p. 198). La même remarque s'appliquerait, en particulier, aux jus de raisin, riches en enzymes.

Or, les travaux de PROKOSCHEV et de MININA et de PROKOSCHEV et DANTCHEVA (25 *a*, *b*) ont démontré la diminution de l'activité des déhydrases en présence seulement de 5 p. 100 de gaz carbonique dans l'atmosphère. Tout récemment, BRESTKINE et IVANOVA (25 *c*) ont constaté que l'activité de la catalase diminue sensiblement en présence du gaz carbonique en raison de la formation d'un composé labile ; cette diminution n'est pas liée à l'augmentation de la concentration en ions-hydrogène.

De toute façon le problème reste posé.

H. — INFLUENCE DE LA PRESSION DU GAZ ET DE LA TEMPÉRATURE

Nous avons vu tout à l'heure que la pression d'un gaz n'influe pas sur le potentiel de l'électrode de platine.

ADJÉMIAN (26) a démontré que le potentiel d'oxydo-réduction des vins mousseux, des vins gazéifiés, se trouvant sous la pression de 5 atmosphères, ne dépend pas de la pression du gaz carbonique. Il découle de ces expériences que, pour la détermination du potentiel d'oxydo-réduction des vins mousseux, l'emploi des récipients spéciaux n'est pas nécessaire ; après l'ouverture de la bouteille et le dégazage partiel du vin à l'abri de l'air, la mesure potentiométrique peut se faire à l'aide des dispositifs habituels. Quant à la température, son influence sur le potentiel est bien connue ; les mesures du potentiel doivent être exécutées à la même température, si l'on tient à la comparaison rationnelle des résultats. Malheureusement notre dispositif à électrodes n'est pas muni d'une chemise thermostatique, ce qui a compliqué la réalisation de nos mesures ; dans la grande majorité des cas ces dernières ont été exécutées aux températures voisines de + 20°C. Le fonctionnement isotherme des piles étudiées présente une importance puisque certaines réactions dans les vins, par

exemple, s'effectuent en fonction de la température, telles que les décompositions des acides dihydroxymaléique, dicétosuccinique.

I. — EXPRESSION DES RÉSULTATS

L'indication du potentiel, jointe à celles du pH et de la température, sont essentielles pour l'expression correcte des résultats des mesures potentiométriques dans les jus de raisin et les vins.

Ossipov (27) propose d'adjoindre à ces données les indices d'oxygène dissous et des peroxydes. Cet auteur base sa proposition sur l'expérience suivante ; après l'enrichissement en oxygène de deux échantillons d'un vin du type Porto, les mesures du potentiel et la détermination de l'indice d'oxygène ont donné les résultats suivants :

			E_HmV	Indice d'oxygène mg/l
			—	—
N° 1	Vin témoin	Vins enrichis d'oxygène ...	424,3	traces
N° 2		» ...	424,4	5,2
N° 3		» ...	424,4	4,9

Remarquons que Ossipov effectue la mesure du potentiel dans 10-15 mn suivant, semble-t-il, la technique de Politova-Sovzenko (*op.cit* (22 b),

A notre avis, il est également important de préciser la valeur de chute du potentiel en fonction du temps, $\frac{\Delta m\mathrm{V}}{\mathrm{T}}$ qui pourrait se situer aux environs de 0,2 mV/mn ce qui équivaut à la variation du potentiel de $\pm$ 3-5 mV dans 15 mn. Cette condition n'est pas excessive au point de vue des tolérances de l'exactitude des mesures. D'après Hewitt (*op. cit.* (8) p. 40), à une sensibilité des mesures du potentiel égale à 2,5 mV, correspond une sensibilité de 0,05 unité pour le pH et 2,5°C pour la température. D'une façon générale, pour avoir une plus grande précision, il faudrait introduire des corrections de toutes sortes (température, coefficients d'activité, etc.) que l'on ne connaît pas pour les liquides qui nous intéressent.

L'échelle des rH_2 a peu d'intérêt surtout sans indication du pH.

L'usage du potentiel, accompagné de l'indication d'autres grandeurs mentionnées plus haut, est conseillé par plusieurs auteurs (*op. cit.* (9)), (28), (29), (30).

IV. — EXPOSÉ DE LA TECHNIQUE DES MESURES DU POTENTIEL D'OXYDO-RÉDUCTION DANS LES JUS DE RAISIN ET DANS LES VINS

A la lumière de toutes les recherches, dont nous avons relaté précédemment les conclusions, il nous est possible de proposer une technique des mesures du potentiel d'oxydo-réduction dans les jus de raisin et les vins.

A. — DESCRIPTION DE L'APPAREILLAGE ET DES DIFFÉRENTS DISPOSITIFS EMPLOYÉS AU COURS DES MESURES POTENTIOMÉTRIQUES

a) Appareillage potentiométrique

Pour connaître le potentiel d'oxydo-réduction des vins et des jus de raisin on utilise ordinairement un voltmètre à lampes destiné à mesurer les différences de potentiel entre une électrode au calomel et les électrodes de platine.

Les qualités, que l'on est toujours en droit d'exiger d'un appareil, sont la stabilité et, par conséquence, la reproductibilité satisfsaiante des mesures.

L'étendue de l'échelle potentiométrique doit permettre la lecture directe de 2,5 mV. D'autre part, il est nécessaire que le voltmètre à lampes soit muni de dispositifs correcteurs de température pour l'électrode de verre, d'une part, et l'électrode au calomel, d'autre part.

La précision des mesures ne doit être affectée par l'augmentation de la température, due à l'échauffement de l'appareil pendant de longues mesures, demandant 3-4 h, comme c'est le cas pour les jus de raisin.

Bien entendu, l'emploi d'un appareillage permettant la mesure et l'enregistrement du potentiel d'oxydo-réduction et du pH est tout indiqué dans le cas des jus de raisin et des vins.

b) Electrodes de platine

Les électrodes de platine doivent être en platine très pur. Nous préférons le type d'électrodes précédemment décrit (voir la fig. 3). Leur vérification se fait suivant le mode opératoire déjà indiqué ; toutefois, pour plus de sûreté nous le complétons par des mesures comparatives dans un vin rouge. En absence des variations sensibles du potentiel ($\pm$ 10 mV) la mise en service des électrodes ainsi vérifiées ne trouve plus d'objections. D'ailleurs, c'est par une sélection patiente que l'on choisira les électrodes sensibles, caractérisées par une « réponse rapide ». La durée des mesures est en fonction de ce facteur.

c) Récipient à électrodes

Pour notre part, nous préférons l'emploi du récipient décrit précédemment et présenté par les figures 2 et 2 *a*.

Les rodages des goulots doivent être irréprochables ainsi que les robinets; seuls ces derniers seront suffisamment graissés. Ces précautions sont nécessaires afin de diminuer les risques de pénétration fortuite de l'air dans le réci-

pient. La «couronne» des conduites (entièrement en verre) destinées à recevoir et à évacuer le gaz inerte, protégeant le liquide expérimenté de l'influence de l'air, est sensée être étanche. Bien entendu, la liaison électrolytique entre les électrodes de platine et l'électrode au calomel doit se faire dans le vin au moyen d'un pont à fil d'amiante soudé au verre, faisant partie de l'électrode au calomel saturé.

d) **Gaz inertes**

La vérification de la pureté des gaz inertes employés, gaz carbonique ou azote pur (qualité R, Sté L'Air liquide), s'effectue très facilement en branchant le dispositif pour contrôle qualitatif de la désaération (voir fig. 4) à l'aide de tubes en caoutchouc pour le vide sans qu'aucune entrée accidentelle de l'air existe. En général, pour un débit très fort pendant 30 mn, on observe dans le cas d'azote R un virage de carmin d'indigo très faible, dont la disparition nécessite une goutte de solution d'hyposulfite de sodium à 7,5-10 g/l environ. Dans les mêmes conditions le gaz carbonique ne donne aucun virage, étant exempt d'oxygène. Cette vérification est répétée avec le récipient à électrodes muni de ses électrodes et de tous les dispositifs, habituellement employés pendant les mesures potentiométriques.

Si le virage du carmin d'indigo est décelé plus rapidement, il y a lieu de rechercher les fuites, surtout dans le cas de l'azote ; en effet, en raison de sa densité, voisine de celle de l'air, son mélange avec ce dernier dans les endroits de fuite se fait sans difficulté. L'avantage du gaz carbonique est évident en raison de sa densité élevée.

Soulignons qu'au cours des mesures potentiométriques suivant notre technique, le gaz inerte ne barbote jamais dans les vins ou dans les jus de raisin ; sa circulation se fait dans l'espace libre au-dessus de ces liquides.

B. — DÉTERMINATION DU POTENTIEL D'OXYDO-RÉDUCTION DANS LES JUS DE RAISIN

Nous préciserons le mode opératoire concernant la détermination du potentiel du jus libéré à partir des baies de raisin frais ou conservés.

En ce qui concerne les jus obtenus par les procédés habituels et conservés dans les bouteilles, leur potentiel est mesuré dans les mêmes conditions que celui des vins.

a) **Mode opératoire**

Les jus de raisin, cueillis frais ou conservés au frigorifique, sont libérés à l'aide de notre pressoir à filtre de laboratoire (*op. cit.* (15)).

I. — Agencement du récipient à électrodes

Le récipient à électrodes employé (voir fig. 2) est relié au pressoir à l'aide d'un entonnoir spécial s'adaptant, grâce à son rodage, au goulot central du récipient. Un robinet permet d'isoler ce dernier par rapport au pressoir.

Les quatre goulots restant reçoivent, en principe, une électrode au calomel, une électrode de platine double, une électrode de verre et un thermomètre.

En général, la mesure du pH se fait à la fin des essais, ce qui permet de remplacer l'électrode de verre par une autre électrode de platine double.

Dans certains cas, si l'on est sûr de l'égalité des températures du jus et du bocal, on pourrait utiliser en tout trois électrodes de platine doubles, c'est-à-dire 6 électrodes simples ; leur nombre minimum, à notre avis, est de 3-4. Pour bien faire, il faudrait doter le récipient d'électrodes d'une jaquette thermostatique dans laquelle circule l'eau du thermostat à l'aide d'une petite pompe aspirante et foulante.

L'azote pur circule continuellement dans la partie supérieur et du récipient à l'aide d'une couronne de tubes reliés aux tubes latéraux des goulots. La vitesse de son passage est réglée de manière à obtenir une suite ininterrompue de bulles gazeuses dans le dispositif à carmin d'indigo.

II. — Technique des mesures

La technique des mesures potentiométriques dans les jus, libérés à l'aide de notre pressoir, est caractérisée par l'absence du lavage préalable des électrodes et du renouvellement éventuel du liquide au cours des essais.

La présence des débris cellulaires ou des particules colloïdales,qui finalement forment des dépôts susceptibles de couvrir partiellement la surface des électrodes de platine ou le pont des électrodes au calomel, nécessite une série d'opérations facilitant leur élimination, telles que des chocs légers contre les parois, les rotations des électrodes autour de leur axe, sans que les rodages quittent les goulots du récipient. L'élimination de ces dépôts est indispensable en raison de leur influence sur le potentiel mesuré. En général, on cherche à faire tomber les dépôts au fond du récipient, ce qui permet plus tard d'effectuer leur évacuation par le fond du récipient.

III. — Précision des mesures

Lors de nos expériences, les mesures du pH et du potentiel d'oxydo-réduction étaient exécutées à l'aide du potentiomètre des Etablissements

Quéré à Bordeaux. L'échelle de cet appareil permet d'apprécier par approximation 2,5-5 mV ; le temps nécessaire pour que la vitesse de chute du potentiel soit devenue égale à environ 0,2 mV par minute, se situe en général entre 3 et 4 h ; les mesures étant faites, par exemple, toutes les 15 mn, nous avons donc $\frac{\Delta m\mathrm{V}}{\mathrm{T}} = \frac{2,5}{15} = 0,2$ mV/mn.

Suivant nos observations, l'écart entre les valeurs extrêmes peut atteindre au maximum 30 mV pour l'ensemble de 6 électrodes de platine simples ; l'écart entre les indications des deux fils de platine d'une même électrode est au maximum égal à 10 mV. Ces différences sont susceptibles de s'atténuer ou de disparaître, si l'on élimine les dépôts formés sur les fils de platine ou si l'on met en court-circuit ces fils par leurs fiches respectives ; d'ailleurs, cette dernière opération concerne seulement chaque électrode double.

C. — DÉTERMINATION DU POTENTIEL D'OXYDO-RÉDUCTION DANS LES VINS

Le même récipient à électrodes est employé pour effectuer les mesures du potentiel dans les vins.

Par suite de la libération du goulot central, occupé, lors de mêmes mesures dans les jus de raisin, par l'entonnoir spécial, on est moins gêné dans l'utilisation des électrodes.

1° Appareillage

Nous avons recommandé dans une publication précédente (*op. cit.* (1 *b*)) un montage spécial permettant la désaération du récipient à électrodes, le prélèvement du vin à l'abri de l'air, et, enfin, le lavage du récipient après les mesures. La jonction entre le montage et le récipient à électrodes (voir fig. 2) s'effectue de la façon suivante : le tube *j* à rodage intérieur est mis en communication, à l'aide d'un tube à rodage extérieur, correspondant avec le tube C_4 représenté sur le dessin n° 3 de notre précédente publication mentionnée tout à l'heure. Bien entendu, l'autre extrémité de ce tube à jonction ne possède aucun rodage, ce qui permet de réunir le tube du montage se trouvant à gauche du robinet à 3 voies R 9. Le goulot du séparateur de BERTRAND S est relié au tube F du récipient à électrodes (voir fig. 2) à l'aide d'un bouchon, d'un tube de verre et d'un tube de caoutchouc. Cette jonction permet la circulation du gaz inerte dans la partie supérieure du récipient à électrodes quand ce dernier est rempli de vin. Une pince de MOHR, disposée sur le tube de caoutchouc, assure la régulation du débit de gaz.

Pour mieux saisir les particularités d'un tel appareillage, le lecteur doit consulter en même temps notre publication précédente (*op. cit.* (1, *b*)). Signalons que nous avons remplacé les tubes en cuivre par des tubes en caoutchouc à vide et par des tubes de verre.

2° Technique des mesures

Pour effectuer les mesures du potentiel dans les vins contenus dans les bouteilles, nous employons pour les prélèvements une combinaison de tubes et de deux robinets à deux voies, décrite dans notre première publication (*op. cit.* (1 *a*)).

D'ailleurs, la figure 1 de ce mémoire représente aussi un petit flacon surmonté de ce dispositif. Etant donné que le diamètre des goulots des bouteilles est variable, nous préparons d'avance une série de bouchons en caoutchouc, à deux trous comportant un tube de verre plus ou moins long, suivant la longueur de la bouteille, et un autre tube plus court ; les extrémités courbes de ces tubes s'adaptent, à l'aide des tubes en caoutchouc, aux branches inférieures, convenablement coupées aboutissant aux robinets à 2 voies. Evidemment, il est plus rationnel de disposer d'une série de combinaisons de tubes et de robinets montés sur des bouchons de différents diamètres ; toutefois, ce montage est assez difficile.

Au début on utilise une bouteille vide du même gabarit puisqu'il faut d'abord désaérer l'ensemble en entier. La durée de cette désaération, à l'aide du gaz carbonique, est d'une dizaine de minutes, si l'ensemble est bien étanche. Le dispositif pour le contrôle qualitatif de la désaération (voir fig. 4) nous renseigne sur le départ complet de l'air.

Le débit du gaz doit être suffisant pour assurer aussi la circulation du gaz dans le séparateur de BERTRAND et de là dans la partie supérieure du récipient à électrodes. La désaération complète étant obtenue, on retire la bouteille vide, utilisée pour cette opération, et on la remplace très rapidement par celle contenant du vin. Par le jeu des robinets on envoie ce dernier, sous l'impulsion du gaz carbonique, dans tous les tubes reliés au récipient à électrodes ; ce vin de lavage est évacué par le robinet L ouvert (voir fig. 2). En fermant ce robinet et en ouvrant celui I, on fait pénétrer le vin dans le récipient en remplissant jusqu'à la naissance des goulots ; ensuite la fermeture du robinet K et l'ouverture du robinet L permettent l'évacuation du vin. Cette opération est répétée 3 fois, sans oublier chaque fois de remplir la portion du tube H, comprise entre le récipient V et le robinet G.

Ensuite on remplit le récipient aux 3/4 de son volume avec du vin ; on ferme le robinet K et le robinet disposé sur la bouteille contenant le vin. On réduit immédiatement le débit du gaz qui circule seulement sur le trajet : séparateur de BERTRAND, partie supérieure du récipient à

électrodes ; ce débit doit être tel que l'on ne puisse pas compter le nombre de bulles gazeuses traversant le dispositif de contrôle de la désaération.

Les mesures du potentiel sont effectuées toutes les 15 mn, ensuite à intervalles de 30 mn et à la fin toutes les 10 ou 15 mn.

Le temps nécessaire pour que la vitesse de chute du potentiel soit devenue égale à environ 0,2 mV /mn, est variable, de 30 mn à 1 h 30 suivant l'état du vin, des électrodes, le nombre des mesures précédentes.

Remarquons que nous n'effectuons les renouvellements du vin dans le récipient à électrodes que dans les cas exceptionnels. A notre avis, cette opération est inutile. Lors de son exécution, il est indispensable d'expulser par le gaz le vin resté dans les tubes d'amenée.

3° **Précision des mesures**

Nous avons constaté, en employant 3 électrodes de platine doubles, qu'en moyenne la différence maximum entre les valeurs observéese st de 10 mV ; la différence entre les indications des deux fils de platine d'une électrode double peut atteindre 5 mV.

Les milieux à potentiel limite, comme les vins, sont souvent caractérisés par le décalage entre les indications des électrodes. D'après WURMSER (*op. cit.* (19) p. 292)), la différence entre les valeurs extrêmes, fournies par des électrodes identiques de platine dans les solutions de glucides, à l'abri de l'air, peut atteindre 12 mV. JOSLYN (*op. cit.* (20) p. 588) a observé, en présence de 12 électrodes de platine, la différence entre les valeurs extrêmes égale à 20 mV pour le vin, tiré d'un fût par siphonage sous protection d'azote ; la valeur moyenne du potentiel par rapport à l'électrode au calomel était de 33 mV pour une série de valeurs échelonnées entre 25 et 45 mV. Dans le même vin, transvasé dans les mêmes conditions, le potentiel donné par deux électrodes de platine était de 33 mV. La précision des mesures était de l'ordre de 5 mV.

Remarquons que pour une électrode choisie les variations du potentiel en fonction du temps peuvent devenir minimes, par exemple, 2,5 mV au bout de 15 mn, par rapport à la valeur de la mesure précédente. Bien entendu, cela n'empêche en rien le décalage entre les électrodes.

V. — POTENTIEL D'OXYDO-RÉDUCTION DES JUS DE RAISIN ET DES VINS

Si les mesures du potentiel d'oxydo-réduction des vins ont fait l'objet de nombreux travaux, les mêmes déterminations dans les jus de raisin sont rares. Nous exposerons successivement, en commençant par les jus de raisin, les résultats de nos expériences sans omettre de citer préalablement les travaux antérieurs.

A. — POTENTIELS D'OXYDO-RÉDUCTION DES JUS DE RAISIN

a) Travaux antérieurs

On sait, d'une façon générale, que les mesures du potentiel dans les jus de raisin sont rares (31).

Pour les jus de raisin on peut citer le travail de JÖRGENSEN (*op. cit.* (24)). Les mesures étaient faites sur un jus de raisin placé dans le vide, mais obtenu à l'air libre. Egalement RENTSCHLER et TANNER (*op. cit.* (4)) ont effectué la détermination du potentiel dans quelques jus de raisin, blancs et rouges.

Il existe un certain nombre de travaux concernant le potentiel des jus de raisin en présence de l'air, par exemple de GARINO-CANINA (*op. cit.* (7)), de RODOPOULO (32).

L'étude du potentiel au cours de la fermentation du moût de raisin a été faite par GARINO-CANINA (*op. cit.* (7)), par SCHANDERL (33), par RODOPOULO (*op. cit.* (31)), par RIBÉREAU-GAYON, PEYNAUD et Mlle LAFOURCADE (35), par RIBÉREAU-GAYON et RIBÉREAU-GAYON (36) ainsi que par JOSLYN (*op. cit.* (20)) et d'autres.

b) Travaux personnels

Pour notre part nous avons effectué les mesures du potentiel d'oxydo-réduction dans les jus obtenus à partir des raisins frais et des raisins conservés au frigorifique.

D'autre part, quelques expériences ont été faites sur le jus extrait en présence d'air et ensuite laissé sous son influence.

I. — Potentiels des jus des baies de raisin fraîchement cueilli

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau VI.

Les jus ont été obtenus à l'aide de notre pressoir à filtre ; gaz inerte employé — l'azote — R.

II. — Potentiels des jus de baies de raisin conservé au frigorifique au cours de l'hiver

Nous avons mesuré les potentiels des jus de raisin conservé, au cours de l'hiver 1953/1954, au frigorifique et acheté au marché de Narbonne.

Pour ces essais on utilisait les baies saines et intactes.

Le tableau VII résume les résultats obtenus. Les données analytiques sont exprimées d'une même manière que celles du tableau VI.

Tableau VI

Raisins mûrs.

Les sucres-réducteurs sont exprimés en g/l de jus ;
L'acidité de titration en milliéquivalents par litre ;
Le potentiel d'oxydo-réduction est rapporté à l'électrode normale d'hydrogène.

Date	Cépage	Sucre	Acidité de titration	Mesures potentiométriques		
				T-re	pH	Potentiel moy. mV
29/IX/1954	Aramon	182	114,3	21	3,2	+ 312
4/X /1954	Morastel	163	134,7	21	3,17	310
5/X /1954	Carignan	240	108,1	20,5	3,22	293
6/X /1954	Terret-Bourret	192	108,1	21	3,0	363
11/X /1954	Macabéo	225,6	57,9	18	3,33	320
12/X /1954	Grenache blanc	234,7	105,9	18	3,12	293
13/X /1954	Terret blanc	184,0	95,9	18	3,15	336

Tableau VII

Raisins conservés au frigorifique

Date	Cépage	Sucre	Acidité de titration	Mesures potentiométriques		
				T-re	pH	Potentiel moy. mV
19/II /1954.....	Servant	—	—	18	3,85	+ 384
20/II /1954.....	Servant	—	—	18,5	3,8	341
12/III/1954.....	Olivette blanche	—	—	19	4,15	289
23/III/1954.....	Hybride blanc	190,7	2,0	19	3,65	353
24/III/1954.....	id.	184,0	2,1	18	3,65	359
24/III/1954.....	id.	186,2	2,1	20	3,75	393

Bien entendu les résultats obtenus seraient beaucoup plus intéressants, si le potentiel était suivi, depuis la cueillette du raisin, en fonction du temps de sa conservation au frigorifique.

Les mêmes raisins ont été utilisés pour étudier l'évolution du potentiel en fonction du temps en présence de l'air. Les jus étaient libérés, comme précédemment, à l'aide de notre pressoir à filtre ; les essais étaient comparatifs, en présence d'air ou d'azote-R. Le point zéro des mesures débutait 5 mn après la fin de l'écoulement des jus.

La libération du jus et les mesures du potentiel, en présence d'azote, n'ont pas donné lieu à la formation du précipité ; le jus était opalescent et son pH de 4,04. Dans les mêmes conditions, mais en présence de l'air, la formation du précipité était nette à partir d'un délai de 40 mn. Les lignes marquées par la lettre (*a*) comprennent les valeurs du potentiel obtenues après la rotation des électrodes.

TABLEAU VIII

Raisin. Olivette blanche
Prise d'essai : 75 g ; température + 18°C.
Date : 24/11/1945

Temps minutes	En présence d'azote		En présence d'air	
	Potentiel EH mV		pH	Potentiel E_H mV
0	+ 410	+ 410	4,3	+ 510 + 507
30	380	380	4,22	445 446
60	368	368	4,2	418 438
			a) 4,2	*a)* 448 449
80	360	362	4,15	*a)* 438 462
85	—	—	4,15	*a)* 438 462

Le jus de Servant, extrait des baies par pression à la main et laissé à l'air libre dans un becher ordinaire, possédait, au bout de 2 h un potentiel de + 579 mV ; son pH a varié de 3,62 à 3,7.

B. — POTENTIELS D'OXYDO-RÉDUCTION DES VINS

a) Travaux antérieurs

Les mesures du potentiel d'oxydo-réduction dans les vins ont fait l'objet de très nombreux travaux.

Il ne nous est pas possible de reproduire les résultats obtenus. Nous avons déjà signalé dans ce mémoire les références des publications se rapportant à ce sujet, à savoir (*op. cit.* (2 *a* et *b*), (3), (4), (5), (6), (7), (11), (20), (22 a b), (23), (26), (27), (33), (34)). Un certain nombre de références citées se trouvent dans nos mémoires précédents (37). Nous avons omis de signaler précédemment le travail de SCHANDERL paru en 1951 (38). D'autres travaux parus seront indiqués dans nos mémoires, à paraître prochainement, consacrés au traitement thermique des vins doux naturels.

b) Travaux personnels

I. — Quelques remarques sur la comparaison des potentiels

Avant d'exposer les résultats de nos mesures potentiométriques nous nous permettons d'attirer l'attention sur les erreurs qui peuvent être commises lors de l'interprétation des valeurs du potentiel d'oxydo-réduction, observées par rapport à l'électrode au calomel saturé et calculées par rapport à l'électrode normale d'hydrogène.

C'est ainsi que dans notre mémoire paru en 1953 (*op. cit.* (37 *a*)),

nous avons omis de préciser que la valeur du potentiel au cours de la fermentation d'un moût de raisin trouvée par GARINO-CANINA (*op. cit.* (7) p. 215) a été mesurée par rapport à l'électrode au calomel ; dans ces conditions cette valeur étant rapportée à l'électrode normale d'hydrogène devient + 60 mV.

ALMEIDA dans son intéressant travail (*op. cit.* (5) p. 18) a souligné les valeurs basses du potentiel observées par GARINO-CANINA. Or, ces valeurs doivent être majorées de + 250 mV ce qui donne au potentiel signalé — 4,5 mV la valeur de + 246 mV, valeur normale pour un vin vieux conservé dans une bouteille.

Par contre, JOSLYN (*op. cit.* (20) p. 588) donne les valeurs du potentiel, d'une part, mesuré par rapport à l'électrode au calomel,, et d'autre part, rapporté à l'électrode normale d'hydrogène.

Dans ces conditions les vins du type Porto ont des potentiels de + 331 et + 231 mV ; après l'aération les E_H deviennent + 438 et + 393 et non + 180 et + 231, comme l'indique ALMEIDA ; la même remarque est valable pour les potentiels des vins italiens aérés mesurés par GARINO-CANINA, ils varient de + 347 à + 440.

Dans ces conditions ces vins sont comparables aux vins de Porto aérés (*op. cit.* (5) p. 20-21).

Dans le tableau II ALMEIDA reproduit les résultats des mesures en E_H, c'est-à-dire en potentiels rapportés à l'électrode normale d'hydrogène, et les compare aux valeurs des potentiels mesurés par GARINO-CANINA et JOSLYN par rapport à l'électrode au calomel.

Nous avons cru bien faire en signalant cette erreur accidentelle glissée dans le travail d'ALMEIDA ; comme on le sait, ce travail constitue une contribution importante à la connaissance des processus oxydo-réducteurs dans les vins de Porto.

II. — **Potentiel d'oxydo-réduction de quelques vins**

Pour notre part nous avons mesuré les potentiels d'oxydo-réduction dans nos vins doux naturels conservés au laboratoire dans des bouteilles couchées. Remarquons que toutes nos mesures ont été effectuées en présence du gaz carbonique et que les potentiels stables, obtenus au bout de 35-90 mn, sont toujours rapportés à l'électrode normale d'hydrogène.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau IX.

Un certain nombre de mesures sera indiqué dans d'autres mémoires à paraître.

Les vins doux naturels, conservés dans les conditions de notre établissement, sont caractérisés par des potentiels bien moins élevés que ceux des vins de Porto. Toutefois, une étude plus systématique serait d'un intérêt certain. Egalement nous avons effectué les mesures du po-

TABLEAU IX

Potentiel d'oxydo-réduction des vins doux naturels

Nature. Provenance	Récolte	Mode de conservation avant l'embouteillage	Mesures potentiométriques			
			Date	T°	pH	E_H mV
A) Vins blancs						
Estagel (P. O.) ...	1950	Terrasse				
» » ...	1950	Bonbonne verre	18/XI/1954	18	3,38	+ 216
» » ...	1950	Foudre, bois	18/XI/1954	18	3,4	+ 278
» » ...	1950	Cuve, ciment	19/XI/1954	15	3,48	+ 220
Estagel (P. O.) ...	1951	— —	16/XI/1954	19	3,42	+ 213
» » ...	1952	— —	24/XI/1954	20	3,5	+ 234
Tuchan (Aude) ..	1952	— —	21/VI/1954	26,5	3,62	+ 226
B) Vins rouges						
Villeneuve-les-Corbières (Aude) ...	1952	— —	5/IV/1954	19	3,12	+ 340

tentiel dans quelques vins conservés au laboratoire, pendant quelques années dans des bouteilles, couchées et parfaitement obturées.

Les valeurs observées du potentiel étaient suffisamment basses comme le montre le tableau X.

TABLEAU X

Potentiels d'oxydo-réduction des quelques vins conservés à l'abri de l'air dans des bouteilles couchées hermétiquement obturées.

Vin (provenance, récolte, type)	Résultats			
	Date de la mesure	T-re	pH	E_H mV
A) Vins rouges				
1) Coursan (Aude) 1952	3/XII/1954	20	3,5	+ 183
2) Tuchan (Aude) 1949 vin de presse (bouteille cachetée) ...	29/VI /1954	29,5	3,65	+ 186
B) Vins blancs				
1) Muscat de Tunisie 1949 vin de liqueur (bouteille cachetée) ..	1/XII/1954	18,5	4,1	+ 94
2) Muscat de Tunisie 1950 vin de liqueur	28/VI /1954	23,5	3,88	+ 185

III. — **Influence du séjour à l'abri de l'air sur le potentiel des vins rouges**

En étudiant les résultats de mesures potentiométriques, effectuées en 1951 par OSSIPOV (*op. cit.* (3)), nous avons été surpris, d'une part, par le peu de variation du potentiel des vins, conservés dans les bouteilles

pendant 15 j, et, d'autre part, par les valeurs du potentiel assez élevées, à notre avis.

Nous avons vérifié l'influence du séjour à l'abri de l'air sur le potentiel des vins rouges de notre région, aérés pendant l'opération de l'embouteillage. Les bouteilles couchées et hermétiquement obturées séjournaient au laboratoire pendant un nombre variable de jours ; on disposait pour chaque échantillon de vin étudié de plusieurs bouteilles.

Les résultats des mesures potentiométriques, effectuées en fonction du temps, sont consignés dans le tableau XI.

TABLEAU XI

Influence du séjour à l'abri de l'air des vins rouges préalablement aérés

Type du vin, récolte	Opération	Date	Résultats		
			T-re	pH	E_H mV
A) Corbières rouges 1953					
N° 1	embouteillage	14/IV/1954	—	—	—
N° 1	mesure	15/IV/1954	18	3,3	+ 256
N° 1	mesure	10/ V/1954	20,5	3,4	+ 112
N° 1	»	»	»	3,4	+ 106
N° 2	embouteillage	30/ V/1954	—	—	—
N° 2	mesure	30/VI/1954	22	3,48	+ 178
B) Minervois rouges (Puichéric)					
a) récolte 1953					
N° 1	embouteillage	9/VI/1954	—	—	—
N° 1	mesure	24/VI/1954	28	3,38	+ 177
N° 1	»	25/VI/1954	28,5	3,38	+ 172
N° 2	embouteillage	5/VII/1954	—	—	—
N° 2	mesure	20/IX/1954	20	3,95	+ 148
b) récolte 1954					
	embouteillage	19/XI/1954	—	—	—
	mesure	26/XI/1954	19	3,39	+ 238
	»	29/XI/1954	19	3,39	+ 223

Il ressort de ces résultats que pour les vins rouges la baisse du potentiel, au bout de 20 j, est très sensible comme c'est le cas pour les vins rouges des Corbières (échantillon n° 1). Dans d'autres cas les valeurs du potentiel, observées au bout d'un certain nombre de jours, ne sont pas également élevées. Ces essais d'orientation n'ont pas la prétention d'être complets puisque nous n'avons pu déterminer parallèlement les indices d'oxygène et des peroxydes.

Nous savons déjà que OSSIPOV (*op. cit.* (26)) considère, comme valeur définitive, celle mesurée dans 10-15 mn après la fin du lavage du récipient et la mise en route de tous les dispositifs. Or, comme nous l'avons déjà démontré, le potentiel obtenu dans ces conditions est souvent très supérieur à celui observé au moment de sa stabilisation en fonction du temps.

Il serait très utile d'envisager, sur l'échelle internationale, la standarisation du mode opératoire concernant la technique de la détermination du potentiel d'oxydo-réduction des vins ; ce mode opératoire doit préciser la nature du gaz inerte à employer, la chute du potentiel en fonction du temps écoulé entre deux mesures consécutives, $\frac{\Delta m V}{T}$.

Au point de vue technologique et scientifique cette mise en ordre a une importance capitale puisqu'elle permettrait dans l'avenir non seulement la comparaison rationnelle des résultats obtenus par différents expérimenteurs pour les vins, mais également l'étude du potentiel de différents systèmes oxydo-réducteurs du vin dans les mêmes conditions ; cette circonstance faciliterait l'interprétation des faits observés.

VI. — CONCLUSION

Le potentiel d'oxydo-réduction des jus de raisin et des vins est sujet à des variations sensibles qui dépendent non seulement de la nature de ces liquides, mais aussi de la façon dont ils étaient obtenus et des traitements qu'ils ont subis et également de la manière et du moment de l'observation définitive choisis lors de sa détermination. Dans ces conditions il est très important de définir exactement les modalités suivant lesquelles doivent s'effectuer les mesures du potentiel. Un certain nombre d'observations, reproduites au cours de cet exposé, nous a amené à conclure que toutes les particularités des déterminations des potentiels des jus de raisin, fraîchement exprimés, et des vins ne sont pas encore suffisamment connues pour qu'on s'autorise déjà à simplifier, pour des raisons de commodité ou de rapidité, leur mode opératoire. Cette simplification, vers laquelle on s'efforcera de parvenir au possible, est concevable comme fruit des efforts collectifs dans le cadre de recherches rationnellement organisées.

Reçu pour publication le 29 mars 1955.

BIBLIOGRAPHIE

(1) DEIBNER (L.). — *a*) Sur un dispositif à écoulement réglable facilitant les mesures électrométriques du potentiel d'oxydo-réduction à l'abri de l'air ; application aux vins. *Ann. Fals. Fraudes*, **43**, juillet-sept., 238, 1950. — *b*) Quelques dispositifs spéciaux facilitant les mesures potent. dans les vins à l'abri de l'air. *Ibidem*, **46**, mars-avril, 111, 1953.

(2) DRBOGLAV (U.). — *a*) Variation de l'oxygène dissous et du potentiel d'oxydo-réduction au cours de la champagnisation des vins suivant le procédé de Chaussepied. *Vinodélié i Vinogradarstvo*, nº 2, 3, 1940. — *b*) RODOPOULO (A.). — Modifications du potentiel d'oxydo-réduction et de la teneur d'oxygène dans les vins au cours de la champagnisation. *Vinodélié i Vinogradarstvo*, nº 9, 3, 1944.

(3) Ossipov (N.). — Influence des opérations technologiques sur le potentiel d'oxydo-réduction du vin. *Vinodélié i Vinogradarstvo*, nº 7, 18, 1951.
(4) Rentschler (H.), Tanner (H.). — Uber die Redox-Potentiale von Getzanken. *Mitt. Lebensmittelnuntersuch. Hyg.*, **43**, nº 4, 294, 1952.
(5) de Almeida (H.). — Contribuiçao para o estudo dos fenomenós de oxidoçâo-reduçâo no Vinho do Porto. *Anais do Inst. do Vinho do Porto*, 1952.
(6) Mareca Cortès (I.). — Aportacion al estudio de los vinos por sus sistémas « redox » : potenciometria ; aplicaciones techicas. *Revista Ciencia Apl.*, nº 37, 97, 1954.
(7) Garino-Canina (E.). — Il potenziale de ossido-reductione e la tecnica enologica. *Annali Chim. Appl.*, **25**, nº 5, 209, 217, 1935.
(8) Hewitt (L.). — Oxidation-reduction Potentials in Bacteriology and Biochemistry. 31, 1950, Edinburgh, Livingstone éd.
(9) Mme Colson Guastalla (H.). — Potentiels d'oxydo-réduction. *Ind. Agr. Alim.*, **70**, nº 6, 467, 1953.
(10) Michaëlis (L.). — Oxydations-réductions Potentiale, 60, 1953, Berlin. d'après Huybrechts (M.). — Le pH. et sa mesure, 321, 1947, Paris, Masson éd.
(11) Baylet (H.). — Contribution à l'étude des essais physiques des vins. 1938, Thèse Pharmacie, Montpellier.
(12) Küster (F.). — Logarithmische Rechentafeln für Chemiker, 148, 1947, Berlin, de Guyter Verlag.
(13) Nekrassov (N.). — Sur le potentiel d'oxydo-réduction non équilibré. *Mikrobiologuiya*, S. S. S. R. **6**, nº 7, 849, 1937.
(14) Palacios (Y.), Vecino (J.). — Influencia de la fase gaseosa sobre el potential del platino en différentes électrolitos. *Rev. Fisica y Quimica*, Esp. **49**-B, nº 7-8, 501, 1953.
(15) Deibner (L.). — Pressoir à filtre de laboratoire pour l'extraction du jus de baies de raisin à l'abri de l'air et à des pressions connues variables *Ind. Alim.* Agr. nº 5 323, 1955 et suite.
(16) Koulnevitch (V.). — Détermination des différentes formes d'oxygène dans les vins. *Vinodélié i Vinogradarstvo*, S. S. S. R. nº 6, 12, 1954.
(17) Ribéreau-Gayon (J.). — Détermination du potentiel d'oxydo-réduction des vins (rH). *Ann. Fals. Fraudes*, **32**, 385, 1939.
(18) Ribéreau-Gayon (J.), Peynaud (E.). — Analyse et contrôle des vins. 1947, 451, Paris-Liège, Béranger éd.
(19) Wurmser (R.). — Oxydations et Réductions, 1930, 292, Paris. Les Presses Universitaires.
(20) Joslyn (M.). — California Wines, *Ind. Eng. Chem.*, **41**, 587, 1949.
(21) Frolov-Bagreev (A.), Agabaliantz (G.). — Chimie du vin, 1951, 269, Moscou, Pischepromizdat éd.
(22) *a*) Mme Saénko (N.). — Modification du potentiel d'oxydo-réduction et de la composition du vin au cours de son séjour sous le voile de Jérèz. *Biochimiya vinodéliya*, S. S. S. R. nº 2, 88, 1948.
b) Mme Politova-Sovzenko (T.). — Sur la méthode de détermination du potentiel d'oxydo-réduction dans les vins. *Vinodélié i Vinogradarstvo*, nº 7, 21, 1952.
(23) Kötcherga (P). — Sur la théorie du vieillissement du vin. *Trav. Inst. Ind. Alim. Krasnodar*, S. S. S. R., nº 6, 27, 1949.
(24) Jorgensen (H.). — Eine Apparatur zur Ausführung von Redox-Messungen im Vakuum. *Bioch. Z.*, **302**, 226, 1939.
(25) *a*) Prokoschev (C.), Minina (A.). — *Biochimiya*, S. S. S. R. **19**, 104, 1954. — *b*) Prokoschev (C.), Dantcheva (E.). — *Biochimiya*, S. S. S. R. **11**, 481, 1946. — *c*) Brestkine (A.), Ivanova (L.). — Activité de la préparation de la catalase dans l'atmosphère du gaz carbonique. *Biochimiya*, S. S. S. R. **20**, nº 1, 54, 1955.

(26) ADJEMIAN (N.). — Dynamique du potentiel d'oxydo-réduction dans le processus de la champagnisation. *Vinodélié i Vinogradarstvo*, nº 1, 31, 1952.
(27) OSSIPOV (N.). — Sur la caractéristique des processus oxydo-réducteurs dans le vin. *Vinodélié i Vinogradarstvo*, nº 12, 17, 1952.
(28) CARPENI (G.). — Oxydo-réduction dans « Techniques de Laboratoire », 1947, 72, Paris, Masson éd.
(29) RIBÉREAU-GAYON (J.). — Le potentiel d'oxydo-réduction en œnologie. *Ch. et Ind.*, **68**, nº 1 *bis*, 98, 1952.
(30) GAROGLIO (P.). — Nuovo Trattato di Enologia, **3**, 882, 1953. Sansoni Edizione Scientifiche.
(31) PATRON (A.). — Les phénomènes d'oxydation dans la production et la conservation des jus de fruits. *Ann. Inst. Fruits et Agrumes Coloniaux*, nº 7, 1953.
(32) RODOPOULO (A.). — *a*) Régulation des processus oxydo-réducteurs pendant l'élaboration des champagnes. *Vinodélié i Vinogradarstvo*, S. S. S.R. **12**, nº 10, 21, 1952. — *b*) Sur les systèmes oxydatifs fermentatifs et non fermentatifs du moût et du vin. *Biochimiya vinodéliya*, S. S. S. R. nº 4, 211, 1953, Moscou, Ac. Sc. S. S. S. R. éd.
(33) SCHANDERL (E.). — Die Mikrobiologie des Weines, 1950, Stuttgart, Ulmer Verlag.
(34) RODOPOULO (A.). — Améliorer la technologie du champagne en cuve close. *Vinodélié i Vinogradarstvo*, nº 11, 33, 1950.
(35) RIBÉREAU-GAYON (J.), PEYNAUD (E.), Mlle LAFOURCADE (S.). — Sur l'influence de l'aération au cours de la fermentation. *Ind. Agr. Alim.*, **68**, nº 3-4, 141, 1951.
(36) RIBÉREAU-GAYON (J.), RIBÉREAU-GAYON (P.). — Étude expérimentale de la vinification rouge. *Ch. et Ind.*, **70**, nº 3, 416, 1953 ; **72**, nº 5, 922, 1954.
(37) DEIBNER (L.). — *a*) Rôle du potentiel d'oxydo-réduction et de la nature de différents systèmes oxydo-réducteurs pendant les transformations et la maturation des vins. *Revue des Ferm. Ind. Alim.*, **8**, nº1, 7 ; nº2, 47, 1953. — *b*) Principales données actuelles sur les facteurs de la Stabilité biologique des Vins Sucrés ou des Vins Spéciaux et sur la régulation de cette dernière. *Ibidem*, **8**, nº 6, 211, 1953.
(38) SCHANDERL (E.). — Élaboration et traitement en cave des vins allemands du point de vue de leur potentiel d'oxydo-réduction. *Der Weinbau*, 5 nov. 1951 (d'après *Bull. Office Int. Vin*, janvier, 133, 1951).

SUR LA VARIATION DES TENEURS EN FER DANS LES VINS, OBTENUS EN PRÉSENCE OU EN ABSENCE D'UNE TERRE FERRUGINEUSE

PAR

Michel FLANZY et Léonce DEIBNER

Station Centrale de Recherches sur l'Œnologie, la Cidrerie et les Jus de Fruits
Narbonne

I. — INTRODUCTION

Les recherches sur les origines du fer des vins ont fait l'objet d'un nombre assez restreint de publications. Elles peuvent être classées en deux groupes.

Dans un premier groupe on peut citer les travaux établissant l'influence de la matière première, le raisin, conjuguée avec les particularités des opérations du pressurage. Le rôle de ce dernier a été montré par Beridzé (1). L'augmentation de la teneur en fer dans les vins dépend du type du pressoir et de la durée de l'opération. C'est ainsi que le pressoir industriel, type Triplex, est susceptible finalement de porter, au bout de 100 minutes, la concentration du fer à 12,2mg par litre au lieu de 2,6 dans le cas de l'essai de contrôle.

Nègre et Cordonnier (2) ont largement démontré l'influence de la matière première, le rôle de surpressurage, l'accroissement de la teneur en fer due au tuyautage d'amenée de la vendange et au matériel traitant cette dernière, plutôt qu'au pressoir et à l'opération du pressurage.

Dans un deuxième groupe s'inscrivent les travaux établissant le rôle des particules terreuses, souillant le raisin ou l'appareillage, dans l'apport exogène du fer.

Milissavliévitch (3) a mis en évidence, par des essais systématiques, l'influence du sable ferrugineux et carbonaté sur l'enrichissement du moût et du vin en fer dans le cas particulier des vignes cultivées dans les terrains sablonneux.

Indiquons encore les recherches effectuées par Dupuy, Nortz et Puisais sur des moûts et vins de la région Poitevine (4). Ces auteurs aboutissent à la conclusion que l'enrichissement est provoqué par le fer ferreux et non par le fer ferrique.

Cette constatation, originale et fort importante, est à l'origine de nos recherches. Nous avons tenu à vérifier s'il y a une relation et laquelle entre la présence de concrétions terreuses et l'enrichissement en fer du moût et du vin.

II. — RECHERCHES PERSONNELLES

A) La méthode de dosage

Préalablement, nous avons appliqué au dosage du fer dans les terres des méthodes exactes et rapides, mises au point dans notre établissement (5). Le mode opératoire élaboré est le suivant : un gramme de terre riche en fer, desséché à l'étuve à 110° et calciné au four électrique à 550°C pendant 5 heures, est traité dans un ballon, muni d'un réfrigérant ascendant, par 50 ml d'acide chlorhydrique normal à l'ébullition pendant 3 heures ; après le refroidissement, on filtre dans une fiole jaugée de 250 ml, en employant pour toutes ces opérations l'acide chlorhydrique normal ; on continue le dosage suivant le protocole opératoire exposé ailleurs.

La comparaison de ce mode opératoire avec celui de Demolon (A.) et Demolon (D.) (6), suivie d'un dosage électrophotométrique du fer, nous a montré l'absence de pertes et même l'extraction plus complète du fer.

La terre ferrugineuse, de couleur rougeâtre, contenait 1,4 p. 100 de fer et 16 p. 100 des carbonates totaux exprimés sous forme de carbonate de calcium.

B) Résultats obtenus

Nos essais ont porté sur les moûts de raisin blanc de Listan. Les moûts ont été vinifiés au laboratoire dans les récipients en verre, en absence et en présence de la terre. En outre, le vin, obtenu à partir du moût fermenté en absence de la terre, a été traité par la même quantité de cette dernière pendant le même nombre de jours nécessaire pour la fermentation.

Les résultats des analyses sont présentés sur le tableau I. Soulignons que le dosage du fer a été effectué suivant les méthodes mentionnées précédemment (*op. cit.* (5)).

Il ressort de ces essais que, pendant la fermentation, l'enrichissement du milieu en fer, aux dépens des bourbes, est sensible ; en présence de la terre employée en petite quantité, de l'ordre de deux grammes par litre de moût, ce qui correspondrait à l'apport probable du fer égal à 29 mg environ, cet enrichissement n'a pas lieu.

Comment expliquer cette différence ? D'une part, il faut tenir compte que les bourbes sont plus riches en fer que les moûts correspondants ;

TABLEAU I

Raisin blanc de Listan
un gramme de terre — 14,56 mg de fer

Opérations	Essai A		Essai B		Essai C	
	Moût	Vin obtenu	Moût	Vin obtenu	Vin à partir du moût sans terre	Vin après le traitement
Terre ajoutée (g/litre)	—	—	2		2	
Durée (jours)	16	—	16		16	
Sucre (g/litre)	180,6	—				
Alcool (% vol.)	—	11,3				
Acidité totale (H_2SO_4 g/litre)	3,0	4,0				
Acidité volatile	—	0,35				
pH	3,25	3,29		3,32		
Fer (mg/litre)	6,0	9,0	6,0	5,5	9,0	5,5

d'autre part, la présence des silicates ou de la silice dans les terres est susceptible de provoquer les phénomènes d'adsorption ou d'absorption vis-à-vis de certains composants des moûts ou des vins.

Partant de l'observation que la terre utilisée contenait de la silice, nous avons effectué une série d'essais comprenant l'addition de la silice pure en poudre aux vins.

Les résultats obtenus ont montré que le même vin de Listan, dont la teneur en fer, après la précipitation naturelle et les filtrations, était de 7 mg par litre, cédait, après 8 jours de traitement, 2 mg de fer par litre à la silice pure ajoutée au vin en raison de 4 g/l.

Un vin doux naturel, traité dans les mêmes conditions, a perdu 5,5 mg de fer par litre sur 22 mg initialement présents. Comme on le voit, l'élimination du fer est de l'ordre de 25-30 p. 100. On peut conclure dans ces conditions que l'adsorption du fer peut être attribuée à la silice ou aux silicates contenus dans la terre utilisée.

Notons qu'à la dégustation, les vins de Listan, obtenus en présence de la terre, paraissent plus fruités, par rapport au témoin, sans qu'aucun goût de terre ait été noté. En définitive, nos essais confirment les résultats des recherches effectuées par DUPUY, NORTZ et PUISAIS (*op. cit.* (4)) sur les moûts et les vins, dont l'acidité a été ajustée à 7,5 g par litre, exprimée en acide sulfurique ; les quantités des terres, contenant 3 p. 100 ou 8 p. 100 de fer, ont été uniformes, 10 g par litre de moût ou du vin. Considérant que l'acidité de nos moûts utilisés était trop faible, nous avons fait appel à un moût plus acide et à une quantité plus grande de la même terre, à savoir 9 g de terre par litre de moût, équivalent à l'apport probable de 131 mg de fer. Les résultats des essais sont consignés dans le tableau II.

Tableau II

Raisin blanc de l'hybride 12375
un gramme de terre — 14,56 mg de fer

Opération	Essai A		Essai B	
	Moût	Vin obtenu	Moût	Vin obtenu
Terre ajoutée (g/litre)	—	—	9	
Durée (jours)	19	—	19	
Sucre (g/litre)	185	—		
Alcool (% vol.)	—	11,1		
Acidité totale (H_2SO_4 g/litre)	7,2	7,4		
Acidité volatile (H_2SO_4 g/litre)	—	0,45		
pH	2,88	2,91		3,12
Fer (mg/litre)	5,6	9,8	5,6	26,8

Il est aisé de constater qu'en absence de la terre, la teneur en fer du vin est plus élevée par rapport à celle du moût ; nous observons le même phénomène constaté précédemment dans le cas du moût de Listan.

Par contre, en présence de la terre l'enrichissement du vin obtenu en fer est notable, presque le triple par rapport au vin issu du moût non traité.

Dans ces conditions, les résultats de ces essais confirment ceux relatés par MILISAVLIÉVITCH (*op. cit.* (3)). Etant donné que les moûts de la première et de la deuxième série de nos essais ont été obtenus dans les mêmes conditions, il y a lieu de penser que, non seulement les microorganismes, comme l'ont démontré DUPUY, NORTZ et PUISAIS (*op. cit.* (4)), mais également les levures sont susceptibles de faciliter la solubilisation du fer de la terre mise en contact avec le jus de raisin. D'après ces auteurs cette solubilisation s'effectue par réduction biologique du fer ferrique.

Cette réduction a été étudiée tout récemment par BROMFIELD (7) ; cet auteur a isolé à partir de sols et d'herbes et ensuite identifié des bactéries réduisant le fer ferrique en différents milieux. Il est à noter que ces bactéries se trouvent à la surface des couches argileuses et non dans la profondeur du sol.

Soulignons que, lors de nos essais avec le moût de raisin hybride, n° 12.375, nous avons constaté, pour le témoin et pour l'essai principal, un dégagement spontané et continu de l'hydrogène sulfuré, tout le long de la fermentation. Il est fort possible que la présence de ce corps, rendant réducteur le milieu, aurait pu favoriser la solubilisation du fer, suivant le processus étudié par DUPUY, NORTZ et PUISAIS. Le rôle de l'hydrogène sulfuré reste à vérifier. Néanmoins, nos observations se rapportant aux moûts, mis en contact avec la terre après le pressurage du raisin propre, mettent en relief, d'une part, le rôle de la nature des moûts, et, d'autre

part, l'influence des levures. D'une manière générale, la présence de la terre dans la vendange constitue une source importante et peut-être principale de la présence du fer dans les vins. Cet enrichissement particulier du vin en fer est en dépendance de la nature des terres introduites, des moûts ou des vins, de la flore microbienne et, enfin, des levures.

CONCLUSION

La confrontation des travaux parus sur le problème de 'enrichissement exogène des vins en fer démontre l'influence importante, sinon prépondérante, des particules terreuses accompagnant les raisins.

Cet enrichissement se produit à partir du fer ferreux. Cette forme est due à la réduction des sels ferriques sous l'action ou des microorganismes du sol, ou des levures alcooliques, ou des deux à la fois.

Toutefois, la confrontation des résultats obtenus par DUPUY, NORTZ et PUISAIS et les nôtres montrerait que l'action réductrice est plus forte de la part des microorganismes du sol que des levures.

Reçu par publication le 5 mai 1955.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) BERIDZÉ (G.). — Les caractéristiques générales des vins du type de Cachetie et les méthodes de leur amélioration. — *Biochimiya vinodéliya* (Biochimie de la production vinicole). S. S. S. R., nº 3, 170, 1950.

(2) NÈGRE (E.) et CORDONNIER (R.). — Les origines du fer des vins. — *Ac. Agr. Fr.*, **39**, nº 1, 1953.

(3) MILISSAVLIÉVITCH (D.). — Influence du sable des terrains sablonneux du Voïvodina sur la composition et la qualité des vins. — *Agr. de Voïvodina*, Yougoslavie, **2**, nº 3, 1954.

(4) DUPUY (P.), NORTZ (M.), PUISAIS (Y.). — Le vin et quelques causes de son enrichissement en fer. — *Ann. de l'I. N. R. A.* — Série E. *Ann. de Techn.*, **4**, 101, 1955.

(5) DEIBNER (L.) et BOUZIGUES (H.). — *a*) Dosage électrophotométrique des traces de fer total dans les vins à l'aide de l'orthophénantroline. *Ann. de l'I. N. R. A.* — Série E. — *Ann. de Techn.*, **1**, nº 3, 283, 1952. — *b*) Procédé rapide de traitement oxydatif des vins secs ou sucrés par voie humide à l'aide du peroxyde d'hydrogène ; son application au dosage électrophotométrique des traces de fer à l'aide de l'orthophénantroline. — *Ann. de l'I. N. R. A.* — Série E. — *Ann. de Techn.*, **2**, nº 4, 389, 1953. — *c*) Dosage de traces de fer total dans les vins. — Mikrochimica Acta, nº 5, 501, 1954.

(6) DEMOLON (A.) et DEMOLON (D.). — Guide pour l'étude expérimentale du sol. — 1933, 188, Paris, Gauthier-Villars, édit.

(7) BROMFIELD (S.). — The reduction of iron oxyde by bacteria. *The Journal of Soil Science*, **5**, nº 1, 129, 1954 (d'après Ann. I. N. R. A., série A. *Ann. Agr.* **5**, nº 6, 1026, 1954).

RECHERCHES SUR L'AROMATISATION ET LE PARFUM DES VINS DOUX NATURELS ET DES VINS DE LIQUEUR

PAR

R. CORDONNIER

Centre de Recherches agronomiques du Midi
(Laboratoire de Recherches de la Chaire de Technologie)

PLAN DU MÉMOIRE

I. — **Introduction** : Le parfum naturel des vins.

II. — **Recherche de l'Aromatisation.**

1° Par réactions colorées : Étude de quelques réactions.

a) Sur les extraits d'aromatisants.
Technique des réactions. Leur sensibilité dans divers solvants.
Rendement d'extraction de ces solvants.

b) Sur des vins aromatisés et non.

2° Par chromatographie.

a) Description de la méthode et mise au point préliminaire.

b) Chromatographie des Aromatisants.

c) Chromatographie des vins aromatisés.

d) Chromatographie des vins non aromatisés : Muscats de Frontignan et d'Alexandrie, Terracina, Grenache.

III. — **Conclusion.**

IV. — **Bibliographie.**

INTRODUCTION

La recherche de l'aromatisation des vins, étant donné la quantité infiniment petite des substances à déceler, est un problème essentiellement qualitatif. Ce problème sera soluble dans la mesure où la différence entre le parfum naturel du vin et le parfum artificiel qu'on lui ajoute, sera suffisamment grande. Il convient donc, en premier lieu, de préciser l'un et l'autre dans la mesure du possible.

Et tout d'abord, qu'entend-on par parfum naturel des vins ?

Les vocables traduisant les sensations organoleptiques que l'on ressent à la dégustation d'un vin sont nombreux : bouquet, arôme, parfum, fruité, sève, etc... et souvent, imprécis.

Ces termes en effet, sont, parfois, employés dans des sens très différents : ainsi, certains auteurs parlent de bouquet pour désigner soit les substances perceptibles au nez, soit les substances provenant de la fermentation seule ou encore de la maturation de la boisson.

Cependant, avec PASTEUR, la plupart des Œnologues distinguent dans le parfum, un bouquet primaire, ou fruité, formé de substances

préexistant dans le raisin, un bouquet secondaire élaboré par les levures lors de la fermentation, un bouquet tertiaire, appelé aussi de cave, qui se développe au cours de la maturation des vins. Ces différentes terminologies peuvent porter à confusion, aussi, nous a-t-il paru utile de définir ce que nous entendrons, dans la suite de cet exposé, par Parfum des vins.

Nous en référant aux expressions, consacrées par l'usage, de « fruité » désignant les qualités d'un vin qui a gardé l'empreinte du cépage dont il est issu et de « bouquet » désignant au contraire les qualités d'un vin arrivé au plein épanouissement de sa maturité, nous entendrons par *Parfum des vins, l'ensemble complexe des sensations olfactives et gustatives résultant des nombreux constituants plus ou moins volatils ayant pour origine, les uns, directement, le raisin, c'est le fruité, les autres, les processus biochimiques liés à la fermentation puis au vieillissement, c'est le bouquet.*

Depuis LIEBIG et PELOUSE en 1836 (1), de nombreux auteurs se sont intéressés à ce problème.

Mais de leurs travaux faits soit sur le vin, soit sur les eaux-de-vie, ou les lies, il est très difficille de dégager la part qui revient aux constituants du fruité et à ceux du bouquet dans l'élaboration du parfum du Vin.

Il faudrait pour cela faire l'étude comparée du moût et du vin provenant d'un même cépage.

Le bouquet : en font partie, tout d'abord, *les alcools*, alcools supérieurs surtout se formant au cours de la fermentation en quantité plus ou moins importante suivant la race de levures et suivant aussi, la nature des acides aminés contenus dans le moût : l'isoleucine donnant l'alcool isoamylique, la phénylalanine, l'alcool phényléthylique ; *les aldéhydes* ensuite, l'éthanal en particulier contribue au bouquet de certains types de vin très spéciaux, vins jaunes du Jura par exemple.

Viennent enfin, *les esters* dont le rôle dans le bouquet, ainsi que nous le verrons plus loin, est encore très discuté.

L'étude faite par ORDONNEAU en 1885 (2) de« l'essence de vin » extraite d'une eau-de-vie par distillation fractionnée à mis en évidence parmi les produits de queue, les alcools n-propylique, n-butylique, amylique, hexylique, les acides caproïque, heptylique, caprylique, pélargonique, caprique, laurique, myristique, ainsi que les propionates et butyrates de Propyle, de Butyle et d'Amyle, alcools et esters qui constitueraient presqu'entièrement d'après l'auteur, le bouquet des vins.

Le Docteur WEBB (3), en 1952, a identifié dans les produits de queue d'une eau-de-vie de raisin, outre les constituants cités plus haut, les alcools isobutylique et Butylique secondaire, et Isoamylique,

les Laurate et Palmitate d'éthyle, le caprylate d'isoamyle, le caprate d'isobutyle.

Il attribue à ces substances un rôle dans l'arôme et le bouquet des vins.

Mais ainsi que nous le mettrons en évidence dans ce travail, et comme l'ont fait d'ailleurs remarquer ORDONNEAU et HENNIG, la distillation peut modifier ou même détruire les substances du bouquet et ceci quelles que soient les conditions de la distillation, pression réduite, atmosphère d'azote : D'après ORDONNEAU et WEBB, les produits de queue des eaux-de-vie contiennent 95 p. 100 d'alcools supérieurs libres et 5 p. 100 seulement d'esters, alors qu'HENNIG ne trouve que très peu d'alcools libres dans l'extrait de vin au pentane qui serait constitué en majorité d'esters.

Ces résultats contradictoires montrent donc bien les modifications importantes que peuvent subir certains constituants du Parfum au cours de la distillation.

C'est pourquoi HENNIG (4), a travaillé directement sur le vin dont il a extrait les constituants du bouquet par le Pentane, sous forme d'une huile qui contenait la presque totalité des esters volatils, le quart des esters non volatils et les trois quart environ des aldéhydes du vin traité.

Ce vin, après traitement avait complètement perdu son bouquet.

D'après la composition chimique de cette huile, le bouquet du vin serait dû, selon l'auteur, essentiellement à des esters des acides acétique, propionique, n-butylique, n-caproïque, caprylique, caprique, laurique et des alcools éthylique, isopropylique, isobutylique, isoamylique.

Il y aurait en plus, mais déterminé avec moins de certitude, les acides i-butyrique, i-valerianique et heptylique ainsi que les alcools n-propylique, n-heptylique et nonylique secondaires.

Quant aux aldéhydes, à l'exception des aldéhydes aromatiques, et aux cétones, elles ne contriburaient au bouquet que pour une très faible part.

Pour PEYNAUD (5), au contraire, le bouquet ne serait pas dû à des esters mais à des substances oxydables, solubles dans l'éther de Pétrole.

Il a constaté en effet que d'une part, il n'y avait aucune relation nette entre les qualités des vins et leurs teneurs soit en esters totaux, soit en esters neutres, soit encore en acides volatils estérifiés (à l'exception de l'acétate d'éthyle dans les vins malades) et que d'autre part, l'extrait éthéropétrolique du vin qui contient bien toutes les substances odorantes puisque le vin traité n'a plus aucun parfum, conserve, après saponification, l'odeur du vin mis en œuvre.

Ces substances insaponifiables seraient en outre très oxydables.

Comme on le voit, le rôle des esters dans le bouquet reste encore

très discuté. Mais il conviendrait à notre avis de faire une distinction nette entre, d'une part, les esters provenant de la fermentation alcoolique et de la maturation du vin, tels que les esthers éthylique des acides acétique, propionique, butyrique, lactique, succinique, malique, tartrique, citrique, en quantité relativement abondante dans les vins, 2 à 10 méq./l mais qui, cependant, d'après les expériences de PEYNAUD, à l'exception de l'acétate d'éthyle, ne contribuent en rien au parfum et à la saveur des vins, et d'autre part, les esters des monoacides gras plus élevés, esterifiés par l'alcool éthylique ou des alcools supérieurs : alcools amylique, isoamylique, butylique, iso-butylique dont le parfum et le caractère fruité sont bien connus mais qui ne se trouvent qu'à très faibles doses dans le vin.

Nous avons classé ces esters parmi les éléments du bouquet car ils peuvent être considérés comme des produits secondaires de la fermentation alcoolique, issus du métabolisme azoté de la levure en particulier. L'essence de lie est d'ailleurs très riche en ces esters et certaines levures *Pichia fermentans* (6), *Candida Krusei* (P. GALZY, travail non publié), possèdent la propriété de former en abondance des esters éthylique et amylique.

Mais, ils peuvent aussi avoir pour origine, les huiles essentielles du raisin : les essences de nombreux fruits en contiennent en effet, c'est le cas par exemple, de la pomme avec les esters amylique des acides formique, acétique, caproïque, caprylique (7).

Ils peuvent donc avoir une double origine, le bouquet et le fruité.

Quoi qu'il en soit, nos connaissances sur l'origine, le rôle et même, la nature des substances du bouquet, sont très limitées.

Le fruité, lui, est une des caractéristiques fondamentales du cépage ; le plus souvent, discret, il arrive cependant, qu'il soit parfois très accusé, c'est le cas des hybrides et de quelques vinifera tels que les Muscats.

Il aurait pour origine, les huiles essentielles contenues dans les fruits et localisées surtout dans la pellicule ; ces huiles pouvant provenir elles-mêmes de glucosides dont l'hydrolyse diastasique libère les aglycones de nature chimique très variées : hydrocarbures terpéniques, composés aromatiques... Les variations en quantité et qualité de ces composants d'un cépage à l'autre décernent à chacun d'eux son parfum caractéristique.

Pour PEYNAUD, ces huiles essentielles du raisin joueraient un rôle primordial dans l'élaboration du Parfum des vins.

Ainsi l'odeur du Labrusca est due d'après POWER, à de l'anthranilate de méthyle (8).

HENNIG signale l'α Terpineol mais en très petite quantité dans un vin de MULLER-THURGEAU ainsi que la Vanilline que l'on a aussi extraite de l'huile de pépins de raisin et l'aldéhyde cinnamique (9).

On aurait identifié également le salicylate de méthyle dans les jus de raisin (10) et les produits de queue des eaux de vie (WEBB), la Vanilline dans les vins et les raisins (11).

ORDONNEAU, par extraction à l'éther du distillat d'un certain volume de moût a isolé une huile essentielle contenant des esters d'acides gras élevés et un terpène, le térébène, hydrocarbure qu'il trouve identique à celui isolé par lui-même dans de l'essence de lie ; Terpène bouillant à 173-175°, formant un chlorhydrate cristallisé fusible à 49° et très oxydable à l'état pur (12).

En ce qui concerne le Parfum du Muscat, AUSTERWEILL émet l'hypothèse que dans les cépages de ce genre, ce serait les composés linalyliques ou leurs dérivés qui donneraient la note muscat (13).

Nous connaissons donc, en fait, très peu de choses sur la composition du fruité ; son étude, d'ailleurs rendue difficile par la faible teneur des baies en ses constituants (les rendements en produits odorants extractibles des jus de fruit par les solvants organiques sont de l'ordre de 0,001 à 0,004 p. 100 (14), et 0,018 p. 100 dans le cas des essais de HENNIG d'extractions du Parfum du vin par le pentane) offrirait cependant, un intérêt certain car il est un facteur important de la qualité des vins et aussi une des caractéristiques constantes et transmissibles par hérédité, du cépage. Il pourrait, à ce point de vue, au même titre que les caractères morphologiques de la feuille, permettre par exemple, de définir et de suivre le cépage jusque dans sa descendance.

En définitive, le parfum naturel des vins est composé pour une part infime, d'huiles essentielles venant de la baie et pour la plus grande part des éléments du bouquet : esters d'alcools supérieurs et d'acides gras plus ou moins condensés en Carbone.

Les éléments de ce parfum naturel des vins en ce qui concerne ceux du bouquet tout au moins, ne paraissent donc pas un obstacle à priori à la recherche des parfums artificiels ajoutés parfois frauduleusement à certains vins « neutres », du point de vue organoleptique.

L'aromatisation est en effet, le plus souvent à base d'extraits divers (de Coriandre et fleurs de Sureau en particulier), dont la teneur en hydrocarbures, terpènes, alcools terpéniques nous éloigne fort des éléments du bouquet des vins (voir en note la composition des essences de Coriandre et de Sureau).

Un doute cependant subsiste quant aux éléments du fruité, aussi, l'étude de vins témoins non aromatisés, à parfum naturel prononcé sera-t-elle particulièrement importante à envisager.

Seuls seront à retenir dans la méthode de détection, les tests qui seront négatifs avec ces témoins.

Note. Composition des essences de Coriandre et de Sureau. (Gildmeister. Les huiles essentielles, tome III, pp. 330 et 634).

Coriandre : α et β pinène, *p* cymène, dipentène, phellandrène (?) et terpinène, terpinolène (?), aldéhyde *n*-décylique et surtout le Linalol droit (coriaudrol) qui présente les 90 % de l'essence, Géraniol, Bornéol gauche. Les esters acétiques de ces alcools.

Sureau : Son huile essentielle contient un Terpène $C_{10}H_{16}$. Son stéaroptène est un mélange d'acide palmitique et d'hydrocarbure paraffinique $C_{28}H_{48}$ nommé Tricosane. D'après Oskar Simon (manuel de Laboratoire pour l'industrie des parfums p. 65). la base du parfum de Sureau serait du Terpinéol.

Le problème de l'aromatisation des vins a été étudié par E. Nitschke et A. Maurel.

Nitschke décrit une méthode basée sur l'indice d'iode et la réaction d'Ekkard de l'extrait chloroformique du vin à examiner, permettant de déceler dans un vin blanc de faibles quantités d'huile essentielle, indiquant une aromatisation par le Coriandre (15).

La méthode de A. Maurel repose sur l'examen dans l'U. V. au spectrographe soit des différentes fractions du distillat du vin étudié, soit de leurs extraits au pentane, évaporés et repris par l'alcool neutre à 95° (16).

Cette dernière méthode nous paraît particulièrement intéressante. Vue la sensibilité des méthodes spectrophotométriques, il semble en effet qu'on puisse arriver à la solution du problème, par l'étude comparée des spectres d'absorption de différents vins naturels et aromatisés.

Cependant la question est loin d'être résolue à priori. En effet, il conviendrait en premier lieu de définir la ou les zones de longueurs d'onde les plus intéressantes pour la recherche des constituants de l'aromatisation.

Nous avons vu que ces constituants étaient essentiellement des Terpènes et alcools Terpéniques. L'U. V. moyen et proche de 2 200 Å à 4 000 Å, faiblement absorbé par ces hydrocarbures, paraît peu indiqué ; l'infrarouge serait semble-t-il plus approprié.

Ces considérations toutes théoriques peuvent néanmoins être contredites par la pratique ; qui nous dit en effet qu'il n'existe pas dans les témoins Muscats des constituants de la série aromatique très opaques à l'U. V. ? Si ces composés ne se retrouvent pas dans les V. D. N. non Muscat, la question sera en partie résolue.

En second lieu, nous devons dire que la méthode spectrophotométrique, de par sa sensibilité même, a ses inconvénients et ses limites : l'absorption d'une radiation lumineuse est très sensible à toutes les influences inter et intra moléculaires, aussi l'interprétation des spectres obtenus à l'analyse d'un mélange à plusieurs constituants inconnus est-elle très difficile.

La solution la plus séduisante serait de pouvoir combiner la spectrophotométrie et la chromatographie, la première technique permettant d'analyser ce que la seconde séparerait.

Nous nous proposons d'ailleurs d'étudier cet aspect du problème dès que nous en aurons les moyens.

Nous nous sommes contentés d'en étudier jusqu'ici, sous la direction de Monsieur le Professeur E. NÈGRE, le côté chimique que nous avons abordé en étudiant les possibilités que pouvaient nous offrir certaines réactions colorées d'une part et la chromatographie, d'autre part.

Cette étude nous a, en outre, permis de mettre en évidence certaines substances entrant, semble-t-il, dans la composition du parfum naturel des vins et dont il serait intéressant de préciser la nature chimique et le rôle.

I. — RECHERCHE DE L'AROMATISATION PAR RÉACTIONS COLORÉES

A) ÉTUDE DE QUELQUES RÉACTIONS SUR EXTRAITS D'AROMATISANTS

Cette étude a été faite sur des extraits au chloroforme et à l'éther de pétrole préparés à partir de 50 gr/l de graines de Coriandre d'une part, de fleurs de Sureau d'autre part.

Ont été essayées, les réactions de BEZSSONOFF à froid et à chaud, d'EKKARD et SABETAY pour les alcools terpéniques ; de CARR et PRICE, SALKOVSKI, LIEBERMANN, TURNER et EHRLICH-MULLER pour les terpènes et sesquiterpènes (17).

Nous avons seulement retenu les réactions de SALKOVSKI, d'EKKARD et de BEZSSONOFF à chaud.

Les autres réactions citées se sont révélées peu sensibles ou négatives.

N-B-1° L'éther de Pétrole réagit légèrement à la réaction d'EKKARD, ce qui exclut obligatoirement les extraits faits avec ce solvant pour les doses limites où la coloration tend à se rapprocher de celle des témoins.

Il suffit dans ce cas d'éliminer le solvant par évaporation sous vide au B. M. à 60° environ, et de reprendre le résidu par du chloroforme.

2° Le chloroforme est positif au réactif de BEZSSONOFF.

Technique des réactions

RÉACTION DE SALKOVSKI.

A 1 ou 2 cc d'extrait, on ajoute 1 cc d'acide sulfurique concentré.

On obtient une coloration rouge avec les sesquiterpènes azulénogènes. La réaction n'est pas spécifique ; de nombreux corps : les stérols, les saponines, le thiophéne, le furfural donnent la même réaction.

Voici les colorations que nous avons obtenues avec certains terpènes, alcools terpéniques, etc...

		(Prise d'essai 1cm³)
Terpinolène	rose violet	
Limonène	jaune brun	
Terpinéol	jaune vert	
Géraniol	jaune vert	
Linalol	jaune brun	
Aldéhyde cinnamique	jaune vert	

Extraits chloroformiques

1° de fleurs sèches de Sureau : forte coloration brun acajou avec un anneau rouge intense à la séparation des couches sulfurique et chloroformique, la phase chloroformique est tentée de jaune.

2° de graines de Coriandre : coloration brun jaune, moins intense que celle de l'extrait correspondant de Sureau.

Extraits éthéro-pétroliques

1° de fleurs sèches de Sureau : Coloration brun jaune

2° Graines de Coriandre : Coloration jaune.

Les extraits de fleurs de Sureau et de graines de Coriandre ont donc une réaction de Salkovski très positive mais la coloration est beaucoup moins intense dans les extraits éthero-pétroliques que dans les extraits chloroformiques.

Réaction de Bezssonoff.

A 1 ou 2 cc d'extrait à l'éther de Pétrole, on ajoute 1 cc de réactif phosphomolybdotungstique (que nous avons préparé suivant la technique de Deniges (18)) et on porte au B. M. bouillant pendant quelques minutes.

On obtient des colorations bleues en présence de doubles liaisons (cyclohexène, benzylidène acétone, linalol, anéthol ionone, squalène, limonène, geraniol, etc...

Les extraits éthéro-pétroliques ont une réaction fortement positive (coloration bleue) pour le sureau, faiblement positive pour le Coriandre.

Réaction de Pettenkoffer ou d'Ekkard.

Cette réaction est positive avec de nombreux composés organiques et entre autres les terpènes et alcools terpéniques.

Technique de la réaction selon Nitscke

« On mélange 2,5 cm^3 de l'extrait chloroformique à étudier avec 1 cc. de solution de saccharose dans un tube à essai qu'on place dans l'eau glacée. Après quelques minutes, on incline le tube à essai, mais sans le sortir de l'eau glacée, et on laisse couler lentement 1 cm^3 de SO_4H_2 concentré le long de la paroi. Après 10 minutes, on agite doucement le tube en ayant soin de ne pas mélanger la couche inférieure d'acide sulfurique avec le liquide surnageant. On répète cette opération plusieurs fois. Après une 1/2 heure, on mélange énergiquement l'acide sulfurique avec la solution chloroformique alcoolique. Il s'est formé 3 couches : 1 couche inférieure, faible, riche en acide sulfurique, une couche supérieure riche en alcool, et une couche médiane, riche en chloro-

forme. La réaction est positive, lorsque la couche médiane a pris une coloration rouge-violet après 3 heures environ.

On néglige la coloration de la couche supérieure, ainsi que celle de la couche inférieure. »

NITSCKE a montré qu'en opérant ainsi à froid, on diminue la sensibilité de la méthode mais qu'on augmente sa spécificifité car elle est alors beaucoup plus sensible pour les huiles essentielles que pour les alcools supérieurs. De plus, en opérant en un milieu chloroformique, la réaction est plus nette. En effet, la coloration rouge-violet due aux huiles essentielles entre seule dans la couche chloroformique, alors que les colorations secondaires, dues à l'action de l'acide sulfurique sur le saccharose, restent dans la couche alcool-acide sulfurique.

Cette technique nous a donné des résultats très inconstants, mais nous avons obtenu une sensibilité et fidélité plus grandes en rajoutant la liqueur de saccharose après l'acide sulfurique, tout en évitant comme dans la technique NITSCKE l'échauffement du tube. Ceci est surtout vrai pour les extraits contenant un mélange complexe de substances réagissant avec l'SO_4H_2concentré. Dans le cas des extraits purs d'alcools terpéniques, les deux méthodes donnent sensiblement les mêmes résultats.

Il semble de plus, que l'élimination d'une partie des substances réagissant à l'acide sulfurique facilite la réaction :

Deux lots d'une même teinture de Coriandre ont été l'un extrait directement au chloroforme (extrait direct), l'autre distillé, et le distillat épuisé au chloroforme.

Réactions	Teinture de Coriandre	
	Extrait direct	Extrait de distillat
—	—	—
de Salkovski	+++++	+
d'Ekkard modifiées ...	++	++++

La réaction de SALKOVSKI faite sur l'extrait direct et sur l'extrait du distillat montre que la plupart des substances réagissant sur l'acide sulfurique ont été éliminées par la distillation, par contre, la réaction d'EKKARD, beaucoup plus intense sur l'extrait du distillat que sur l'extrait direct paraît indiquer que les substances éliminées gênaient la réaction.

Notons enfin, que les extraits éthéro-pétroliques, beaucoup moins riches en substances ayant une réaction de SALKOVSKI positives ont souvent une réaction d'EKKARD plus positive que les extraits chloroformiques correspondants qui sont plus riches, eux, en substances réagissant avec l'acide sulfurique.

Description de la technique

Dans un tube à essai, à quelques centimètres cubes d'extrait, on ajoute 1 cm^3 d'acide sulfurique concentré, on laisse se développer la coloration caractéristique de la réaction de SOLKOVSKI puis, on plonge le tube dans de la glace et on ajoute 1 cc de saccharose à 1 p. 100 dans l'alcool à 96°. On agite plusieurs fois doucement jusqu'à ce que la coloration violette soit à son maximum puis énergiquement.

Pour une prise d'essai de 1 cm^3, les extraits éthéro-pétroliques et chloroformiques contenant 50 g/l de Sureau d'une part et de Coriandre d'autre part ont eu une réaction d'Ekkard modifiée très intense.

Sensibilité de ces réactions

Nous l'avons exprimée par le poids d'aromatisant, en milligramme, contenu dans la prise d'essai nécessaire pour que la réaction considérée soit positive sans ambiguïté : EKKARD coloration violette dans la couche chloroformique ; SALKOVSKI, nette coloration vert-jaune ou brun de la couche sulfurique.

Les extraits à l'éther de pétrole ont été évaporés sous vide et à 60° et repris par un égal volume de chloroforme et les réactions faites suivant les techniques décrites plus haut :

A 2 cc d'extrait on a ajouté 1 cc d'acide sulfurique concentré pour la réaction de SALKOVSKI, puis après refroidissement dans la glace, 1 cc de Saccharose à 1 % dans de l'alcool à 96° pour la réactions d'EKKARD modifiée, et enfin, dans une autre prise de 2 cm³, 1 cm³ d'acide Phosphomolibdotungstique, préparé suivant la technique DENIGES, pour la réaction de BEZSSONOFF.

Les résultats rassemblés dans le Tableau montrent que :

TABLEAU I

Sensibilité des réactions exprimées en mg d'aromatisant dans la prise d'essai.

	Sureau	Coriandre
SALKOVSKI		
Éther de pétrole	5 à 10 mg	10 mg
Chloroforme	5 mg	5 mg
EKKARD		
Éther de pétrole	5 mg	entre 2,5 et 5 mg
Chloroforme	5 mg	idem
BEZSSNONOFF		
Éther de pétrole	50 mg environ	plus de 50 mg

1° Les sensibilités des réactions d'EKKARD et de SALKOVSKI sont du même ordre pour un solvant donné ; par contre, la réaction de BEZSSONOFF et beaucoup moins sensible que les précédentes.

2° Le chloroforme dissout d'avantage de substances positives à la réaction de SALKOVSKI que l'éther de Pétrole, mais les deux solvants se valent du point de vue des substances positives à la réaction d'EKKARD.

Ces derniers résultats relatifs au pouvoir solvant du chloroforme et de l'éther de Pétrole ont d'ailleurs été confirmés par des essais d'extraction des Parfums de Sureau et de Coriandre à partir des « teintures » de ces aromatisants :

Un certain volume de teinture à 20 % d'alcool contenant 500 mg d'aromatisant à été épuisé par 25 cm³. de solvant dans des ampoules à décantation. Après l'extraction, les liquides épuisés et les extraits ont été séparés et ces derniers, lavés à l'eau et filtrés.

Nous avons apprécié le rendement d'extraction du solvant par l'intensité des réactions de SALKOVSKI et d'EKKARD sur ces divers extraits.

TABLEAU II

	SALKOVSKI	EKKARD modifié
Extrait de teinture de Coriandre		
à l'éther de Pétrole		
Essai I	à peine +	++++
Essai II	idem	++++
Essai III	idem	+++
au chloroforme		
Essai I	++++	+
Essai II	+++	+
Essai III	+++	++
Extrait de teinture de sureau		
à l'éther de Pétrole		
Essai I	++	++
Essai II	++	+
Essai III	++	+
au chloroforme		
Essai I	+++	++
Essai II	+++	+
Essai III	++++	++

Ces résultats montrent donc bien que le chloroforme a un meilleur rendement d'extraction que l'éther de Pétrole, pour les substances positives au SALKOVSKI ; ce serait par contre l'inverse pour les substances ayant une réaction d'EKKARD positive tout au moins en ce qui concerne les teintures de Coriandre.

En définitive, pour la recherche des constituants du Parfum du Sureau et du Coriandre, seules doivent être retenues, parmi les réactions essayées, celles de SALKOVSKI et d'EKKARD ; *de plus, en ce qui concerne les solvants d'extraction, le chloroforme semble préférable à l'éther de Pétrole mais seulement pour les substances ayant une réaction de* SALKOVSKI *positive.*

Ces différents points étant acquis, il reste maintenant à envisager l'étude de vins aromatisés et des témoins correspondants, par ces mêmes méthodes d'extraction et de révélation.

B) ÉTUDE SUR VINS DES RÉACTIONS DE SALKOVSKI ET D'EKKARD.

Elle a été faite à partir d'extraits au chloroforme d'une part et à l'éther de Pétrole d'autre part, de vins non aromatisés et des mêmes vins additionnés, soit de Coriandre, soit du Sureau.

L'extraction

L'échantillon de vin, d'un volume de un litre et demi, placé dans une ampoule à décantation de cinq litres était soumis à une première extrac-

tion par 37,5 cm³. de solvant (soit 25 cm³. par litre de vin) puis à une deuxième par un volume identique de solvant frais (chaque extraction se faisant en 25 agitations successives tout en évitant le plus possible la formation d'émulsion.

Les deux extraits, ainsi obtenus, étaient réunis, lavés à l'eau distillée, filtrés et évaporés, sous vide au B. M. à 60° ; jusqu'à obtention d'un volume final de 37,5 cm³.

C'est ce volume final de 37,5 cm³. que nous avons appelé extrait non concentré (voir en particulier l'étude chromatographique des vins témoins p. 96).

Les extractions par l'éther de pétrole ont été rendues beaucoup plus aisées par le fait que ce solvant a moins tendance à s'émulsionner que le chloroforme.

Dans le cas d'émulsion, quelques gouttes d'alcool à 96° suffisent à les détruire.

TABLEAU III

Extraits				
	A lé'ther de Pétrole		au chloroforme	
	SOLKOVSKI	EKKARD	SOLKOVSKI	EKKARD
Expérience I				
Grenache de l'année (Témoin I).....	+	±	4 +	±
idem + 1 g coriandre/l.	+	+	4 +	+
idem + 5 g sureau/l..	+	—	5 +	±
Expérience II				
Grenache de 2 ans (Témoin II)	++	+	7 +	+
idem + 1 g coriandre/l	++	+	7 +	+
idem + 5 g sureau/l..	++	+	7 +	+
Expérience III				
Clairette du Languedoc vinifiée en V.D.N. et encore trouble.....	3 +	2 +	4 +	2 +

La réaction d'EKKARD est positive lorsque l'on observe une coloration violette dans la couche chloroformique.
± : légère coloration violette dans la couche chloroformique mais pas suffisante pour considérer la réaction comme positive.
+ : coloration violette nette dans la couche chloroformique. La réaction est positive mais faiblement.

Les extraits éthéro-pétroliques sont incolores alors que tous ceux au chloroforme sont colorés en jaune : très faiblement pour le grenache jeune et beaucoup plus fortement pour le grenache vieux, les vins aromatisés par le Sureau et la Clairette du Languedoc.

Les résultats du tableau III montrent que :

1° Le chloroforme est un solvant d'extraction moins spécifique que l'éther de Pétrole, il extrait en particulier, de nombreuses substances contenues normalement dans le vin, pigments colorés tout spécialement et ayant une réaction de SALKOVSKI fortement positive et une réaction d'EKKARD négative.

Il paraît donc opportun de retenir seulement l'éther de Pétrole comme solvant d'extraction.

On sait, d'ailleurs que les oses, gommes, mucilages, matières pectiques, tanins, flavones, chlorophylles, étholides, saponines, sont insolubles dans l'éther de Pétrole, les résines et les hétérosides peu ou pas solubles, les alcaloïdes, les lipides, les hydrocarbures terpéniques et les dérivés benzéniques solubles.

Nous n'avons pas essayé le Pentane et l'Hexane, mais ces solvants auraient vraisemblablement donné des résultats comparables à ceux obtenus avec l'éther de pétrole.

2° La réaction de SALKOVSKI étant dans la plupart des cas tout aussi positive dans les témoins que dans les vins aromatisés, n'offre pratiquement aucun intérêt.

Mais nous verrons qu'il n'en est pas de même dans le cas de la chromatographie.

3° Les réactions de SALKOVSKI et d'EKKARD très positives dans un vin contenant des levures en suspension montrent que les levures sont un facteur d'erreur important. Il convient donc de filtrer les vins avec le plus grand soin avant l'analyse. Nous avons filtré tous les échantillons sur terre d'infusoire.

4° La réaction d'EKKARD nous a permis de déceler l'aromatisation par le Coriandre mais non pas le Sureau. Elle ne permet cependant pas d'avoir une certitude absolue car la différence entre les extraits des vins aromatisés et des témoins correspondants n'est pas assez nette dans la plupart des cas.

Nous sommes donc moins affirmatifs sur ce point que NITSCHKE et ceci d'autant plus que tous les extraits concentrés cinq fois ont une réaction d'EKKARD très nettement positive même dans les témoins. Nous pouvons peut être expliquer cette divergence de vue par le fait que cet auteur a travaillé sur des types de vins nettement différents de ceux que nous avons étudiés.

Enfin, dernier point, les analyses des extraits éthéro-pétroliques de Muscats vinifés en vins doux naturels, d'origines et d'âges différents mais issus du même cépage à petits grains de Frontignan, ont donné sensiblement les mêmes résultats que les analyses d'extraits de Grenache : Tous les extraits non concentrés ont eu une réaction de SALKOVSKI, faiblement positive dans le cas de VDN de l'année sauf en ce qui concerne le Lunel et beaucoup plus fortement positive dans le cas des vieux Muscats. Quand

Tableau IV

Extraits à l'éther de Pétrole

	Salkovski	Ekkard
Muscat de l'année (origine) :		
Frontignan	à peine positif	négatif
Pyrénées Orientales	positif 1 +	±
Ecole	à peine positif	—
Lunel	2 +	—
Muscat vieux (origine) :		
Frontignan 1953	2 +	—
Frontignan 1949	2 +	—
Pyrénées Orientales 1953	3 +	±
Pyrénées Orientales 1949	3 +	—
Lunel 1951	2 +	±
Lunel 1953	3 +	±

à la réaction d'Ekkard, elle a été pour tous les vins, pratiquement négative dans les extraits non concentrés et très franchement positive dans les extraits concentrés 5 fois. Le test des réactions colorées paraît donc insuffisant à déceler une aromatisation de façon catégorique.

Dans une étude complémentaire nous avons cependant cherché à nous rendre compte de l'origine et de la nature de ces substances ayant des réactions de Salkovski et d'Ekkard positives. Ont-elles pour origine le moût, c'est-à-dire la baie, donc le fruité, où les processus biochimiques de la fermentation alcoolique et du vieillissement, c'est -à-dire le bouquet A quelle classe de composés sont-elle à rattacher du point de vue chimique ?

La première question a été résolue par l'étude de moûts de Grenache et de Muscat stabilisés par addition de 16 p. 100 d'alcool (mistelles) qui nous a permis de nous rendre compte que ces substances ne provenaient ni de la fermentation ni du vieillissement : les mistelles ont en effet des réactions colorées identiques à celles des vins doux naturels correspondants. Ces substances auraient donc pour origine, la baie.

Cependant, l'intensité plus grande de ces réactions dans la plupart des vins vieux semblerait montrer qu'il se forme de ces substances au cours du vieillissement mais cette considération n'a rien d'absolu car il se peut, et c'est même probable, que la teneur du milieu en ces substances responsables du fruité, dépende des conditions climatologiques de l'année et sans doute aussi du sol.

Pour élucider ce problème, il faudrait suivre le même vin au cours de son vieillissement.

Deuxième question, la nature chimique ; un premier essai nous a montré qu'elles étaient volatiles et qu'il semblait même s'en former au cours de la distillation.

En effet, les extraits des distillats ont des réactions beaucoup plus fortement positives que les extraits de vins ou de mistelles correspondants.

Muscat de Frontignan	SALKOVSKI	EKKARD
Extrait du VDN	à peine positif	négatif
Extrait du distillat de VDN.....	très fortement positif	très fortement positif
Extrait de mistelle	à peine positif	négatif
Extrait du distillat de ce mistelle....	très fortement positif	très fortement positif

Cela ne paraît pas provenir d'un meilleur rendement de l'extraction dans le cas du distillat, car nous n'avons observé aucune différence sensible entre l'extrait du distillat et l'extrait obtenu à partir d'un distillat auquel on avait ajouté le résidu de distillation.

Par contre, si le vin est alcalinisé avant la distillation, l'extrait de son distillat ne présente plus de différence par rapport à l'extrait du vin.

En définitive, il se formerait donc au cours de la distillation en milieu acide, mais pas en milieu alcalin des substances ayant des réactions de SALKOVSKI et d'EKKARD très positives, et présentes également dans le vin ou le moût mais en plus petites quantités.

La distillation en milieu acide ne provoquerait-elle pas, l'hydrolyse de composés, hétérosides peut être, dont les produits d'hydrolyse seuls seraient extraits par l'éther de pétrole et auraient des réactions de SALKOVSKI et d'EKKARD positives ?

Les résultats des essais de distillation en milieu alcalin tendraient à prouver que ces composés font partie de l'insaponifiable puisque dans ce cas, l'extrait direct et l'extrait du distillat donnent sensiblement les mêmes réactions colorées.

Nous avons donc cherché à élucider le problème de leur nature chimique en faisant ces réactions colorées sur des extraits chloroformiques à 1 g/l (prise d'essai 2 cm^3).

1er d'esters : tartrate, malate, formiate, propionate, butyrate, succinate, caprate, valérianate d'éthyle, acetate, butyrate et valérianate d'amyle, acétates de propyle et de butyle.

2e d'alcools : Butylique, propylique, isoamylique, octylique, phényléthylique.

3e d'aldéhydes : éthylique, heptylique, furfural.

4e d'aldéhydes aromatiques : cinnamique, benzoïque.

5e de lactones : ambrettolide (lactone à odeur de musc en C_{14}), coumarine.

6e d'irone.

7e de Terpènes et alcools terpéniques : Limonène, terpinéol, géraniol, linalol.

8e d'acétal enfin, dont on sait qu'il se forme une quantité non négligeable pendant la distillation (19).

Tous les extraits d'esters, d'alcools, lactones, irone ont donné, à la concentration étudiée, des réactions négatives ou trop faiblement positives pour expliquer les réactions fortement positives des distillats du vin.

Seules, parmi les aldéhydes, le Furfural et les aldéhydes aromatiques ont eu une réaction de SALKOVSKI très positive mais une réaction d'EKKARD négative.

Quant aux Terpènes et alcools terpéniques, ils ont été très positifs aux deux réactions.

Il semble donc bien que les corps ayant les réactions de SALKOVSKI et d'EKKARD positives, en petites quantité dans le vin où le moût, en plus grande quantité dans les distillats ne soient ni des esters, ni des aldéhydes, ni des alcools supérieurs de la série grasse mais bien plutôt des composés de la classe des hydrocarbures terpéniques ou de la série aromatique.

En définitive, si le test des réactions colorées étudiées est insuffisant à déceler d'une façon catégorique une aromatisation par le Coriandre ou le Sureau, il nous a permis cependant, d'une part de mettre en évidence dans les extraits de vin aux solvants organiques des substances dont la nature chimique est à préciser mais qui ont pour origine le fruit, et d'autre part de déterminer que l'acide sulfurique, par la réaction colorée très intense qu'il donne avec ces substances, pouvait être un révélateur chromatographique de choix pour ces dernières, ce qui nous a été fort utile dans la seconde partie de ce travail, que nous allons abordée maintenant.

II. — RECHERCHE DE L'AROMATISATION PAR CHROMATOGRAPHIE

a) DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Nous avons adapté, à l'étude des extraits de Sureau, de Coriandre et de vins une méthode chromatographique de séparation des terpènes, alcools terpéniques et composés aromatiques mise au point par KIRCHNER, MILLER et KELLER (20).

Cette nouvelle technique combine certains avantages de le chromatographie sur papier (facilité de révélation et rapidité d'exécution entre autres) à ceux de la chromatographie sur colonne, méthode jusque là utilisée pour l'étude des composés terpéniques.

C'est à la fois, une chromatographie d'adsorption et de partage.

Des lames de verre sont recouvertes de l'adsorbant, alumine ou acide silicique, sur lesquelles il adhère grâce à un liant, amidon ou plâtre.

Une ou plusieurs gouttes de l'échantillon sont déposées à une extrémité de la lame que l'on introduit dans un tube à essai au fond duquel est placé un tampon de coton imbibé du solvant de développement, et on bouche le tube. La lame est retirée puis séchée, quand le solvant a parcouru le trajet désiré.

Le chromatogramme est alors soumis aux réactifs de révélation appropriés.

Préparation des lames

Ces lames sont des bandes découpées dans du verre à vitre ordinaire de 17 à 18 cm de long et de 1,5 cm de large.

Une certaine quantité de mélange adsorbant contenant 80 p. 100 d'Alumine (ou d'acide Silicique) et 20 p. 100 de plâtre de Paris, obtenu en mélangeant soigneusement ces produits à sec, est triturée avec assez d'eau pour former une pâte à peine fluide qui est immédiatement étendue sur les lames de verre en une couche mince et la plus homogène possible.

Ces lames séchées ensuite à 75°-80° sont utilisables aussitôt après refroidissement.

Les solvants et adsorbants

Ont été essayés, comme solvants de développement, les mélanges suivants :

Acétate d'éthyle 15 p. 100, éther de Pétrole 85 p. 100 (1)

et

Acétate d'éthyle 15 p. 100, chloroforme 85 p. 100

comme adsorbants . l'alumine pour chromatographie Prolabo, N° 20.995 et l'Acide silicique Merk tamisé au tamis 200.

Après de nombreux essais, nous avons retenu le mélange acétate d'éthyle 15 éther de Pétrole 85 et comme adsorbant l'acide Silicique.

A défaut d'acide silicique, l'Alumine peut convenir mais il est plus difficile d'obtenir avec ce produit, des lames très homogènes, ce qui se traduit par quelques inégalités des Rf (2) et aussi une moins bonne séparation des terpènes, par contre les spots sont révélés d'une façon plus intense que sur Acide Silicique. De plus nous avons constaté des différences entre les divers échantillons d'une même alumine aussi avons-nous abandonné ce produit pour n'utiliser que l'acide Silicique Merck.

(1) Acétate d'éthyle pur et éther de Pétrole D^{e} 0,650-0,660, portant respectivement les n° 23-880 et 23-837 dans le catalogue Prolabo.

(2) Rappelons que le Rf est le rapport des distances parcourues par la substance à révéler et le solvant de développement.

Révélation des lames

Les révélateurs

Fluorescéine-brome. — On pulvérise une solution de fluorescéine à 0,05 p. 100 sur les lames qui sont ensuite exposées aux vapeurs de Brome. Ce dernier se combine à la fluorescéine pour donner de l'éosine qui colore toute la surface des lames, en rose, à l'exception des endroits où se trouvent des composés susceptibles de fixer le Brome par leur double liaisons, qui restent colorées en jaune.

Cette réaction ne nous a pas donné de résultats suffisamment sensibles.

Acide sulfurique concentré. — Nous a permis de révéler sur un chromatogramme les six contituants du mélange suivant : cinnamaldéhyde terpinéol, Limonène, terpinolène, géraniol, linalol à la concentration approximative de 20 γ (Spot de départ 20 gouttes (0,1 cc) d'une solution contenant 200 mg environ de chaque produit par litre).

Il s'est montré également un révélateur excellent des chromatogrammes d'extraits de Sureau et Coriandre.

La révélation doit se faire sitôt après le développement ou sur les chromatogrammes conservés à l'abri de l'humidité. Cette précaution est importante.

Réactif *de* **Bezssonoff.** — Nous avons vu dans la première partie de ce travail que les extraits à l'éther de pétrole de Sureau et Coriandre ont une réaction de Bezssonoff positive à chaud, aussi avons-nous songé à ce réactif pour révéler les plaques, et mis au point le mode opératoire suivant :

Les plaques après développement, sont séchées puis pulvérisées avec le réactif. Aucune réaction à froid. Elles sont ensuite déposées sur un platine de Malassez que l'on chauffe très progressivement (ne pas chauffer trop fort sinon les chromatogrammes brunissent). Au bout de quelques minutes on voit apparaître des taches de plus en plus nettes. (Il faut en général de 15 à 30 minutes pour qu'elles arriventà leur intensité maxima).

Si les chromatogrammes sont exposés, après révélation, à l'humidité les taches prennent une belle coloration bleue. Cette révélation a donné d'excellents résultats avec le Sureau et le Coriandre.

Mise au point préléminaire

Nous insisterons tout particulièrement sur ce point car s'il est facile d'obtenir une séparation relativement bonne des constituants d'un mélange, il est par contre beaucoup plus délicat d'arriver à une très bonne

séparation et à des résultats reproductibles d'une expérience à l'autre. Il faut, pour cela, observer dans la préparation des lames, des précautions rigoureuses que nous avons mises en évidence après une période de tâtonnements et d'expériences sur un mélange de 3 constituants (Géraniol, Terpinéol, Linalol) :

Dessiccation des lames. — Pour une bonne séparation des constituants il faut en premier lieu, que les lames soient bien sèches : un séjour de deux heures, des plaques à l'étuve s'est révélé insuffisant surtout dans le cas de l'Alumine, les taches sont alors déplacées vers le haut du chromatogramme et les constituants sont très mal séparés les uns des autres : le pourcentage des chromatogrammes réussis est alors très faible et les R*f* des constituants séparés sont très irréguliers.

Nous préparons les plaques le soir pour le lendemain et les entreposons à l'étuve à 75-80°.

Une exposition trop longue à l'air avant leur emploi est néfaste également. Le maintien des lames pendant 30 minutes à l'air a provoqué des variations importantes dans la valeur des R*f*, qui ont augmenté, ainsi qu'une forte diminution dans le pourcentage des chromatogrammes réussis.

TABLEAU VI

Valeurs des R*f du Géraniol-Terpinéol, Linalol*

Utilisation des plaques	Sur Alumine	Sur Acide Silicique
Dès la sortie de l'étuve	0,28 — 0,43 — 0,53	0,52 — 0,61 — 0,73
Une 1/2 heure après.....	0,35 — 0,49 — 0,60	0,56 — 0,66 — 0,77

L'épaisseur et l'homogénéité de l'adsorbant déposé sur les lames est également un facteur important de variation des R*f* :

les Rf sont beaucoup plus grands sur les lames minces que sur les lames épaisses :

TABLEAU VI

Valeurs des R*f du géraniol-Terpinéol-Linalol*

	Sur Alumine	Sur Acide Silicique
Lames épaisse	0,18 — 0,37 — 0,52	0,48 — 0,58 — 0,72
Lames minces	0,24 — 0,44 — 0,55	0,56 — 0,67 — 0,78

Les lames très minces donnent enfin, de mauvaises séparations où des R*f* aberrants.

Il est donc indispensable, dans la fabrication des lames, d'opérer tou-

jours de la même façon : définir notamment le poids d'adsorbant et le volume d'eau nécessaires pour faire la pâte ainsi que la quantité de celle-ci à étendre sur une surface donnée de la lame.

Pour avoir une bonne homogénéité des lames, il est préférable enfin, de ne faire que la quantité de pâte nécessaire à la fabrication d'un très petit nombre de lames (1) (5 au maximum).

Voici les normes de fabrication que nous avons adoptées après de nombreux essais comparatifs, pour des lames de 1,5 cm de large que nous recouvrons d'adsorbant sur une longueur de 13 cm.

TABLEAU VIII

Mélange absorbant	Poids du mélange	Volume d'eau nécessaire	Nombre de lames 13 cm de long, 1,5 cm de large
Acide Silicique Plâtre...	2 g	5,5 cc	4
Alumine Plâtre	7 g	5,5 cc	5

La régularité et la valeur des R*f* ainsi que la bonne séparation des taches peuvent enfin dépendre de la quantité de produit déposé au spot de départ, mais ceci n'est valable que pour les très fortes concentrations, les R*f* sont alors plus élevés et les séparations se font mal.

D'après les essais que nous avons faits avec le géraniol, le terpinéol, le linalol et le limonène, une quantité de substances de 50 γ environ au spot de départ donne de bons chromatogrammes.

Enfin, dernier point important si l'on veut établir avec quelques certitudes le R*f* d'un constituant, il faut prendre la précaution d'une part de calculer sur un nombre suffisant de chromatogrammes (une vingtaine environ) car les R*f* ne sont déterminés malgré toutes les précautions citées qu'à 2 à 5 % près (2), et d'autre part, d'intercaler dans les séries de chromatogrammes expérimentaux, des chromatogrammes de composés témoins dont les R*f* serviront de référence et de contrôle d'une expérience à l'autre.

Ils rendent en outre possible la comparaison de résultats établis dans des laboratoires différents. En effet, cette méthode de chromatographie sur lames ne peut donner, à l'inverse de la chromatographie sur papier où les supports d'adsorption sont normalisés, des R*f* ayant une valeur absolue. Nous soulignons donc bien le fait que les R*f* donnés dans la suite de cet exposé n'ont qu'une valeur relative, calculée à 2 à 5 p. 100 près.

Les normes de préparation des lames recouvertes d'adsorbants et les précautions à prendre, étant ainsi bien définies, nous citerons à titre

(1) Quand on prépare suffisamment d'adsorbant pour faire une longue série de lames, la pâte ne reste pas homogène, elle s'épaissit très rapidement à cause de la prise du plâtre qu'elle contient.

(2) La fabrication des lames d'adsorbant demande un certain entraînement avant d'arriver à ces limites d'erreurs.

d'exemple les résultats obtenus à partir d'une solution dans l'éther de Pétrole d'un mélange de Limonène, Linalol, Terpinéol et Géraniol dont les R*f* nous ont servi de références au cours des nombreuses séries de chromatogrammes de la partie expérimentale qui va suivre.

Ces constituants ont été très nettement révélés, pour une concentration de 37 γ de chacun d'eux aux spots de départ des chromatogrammes, par l'acide sulfurique concentré mais moins nettement par le réactif de BEZSSONOFF, quant à la réaction fluorescéine Brome, elle est très difficile à réussir et nous a donné des résultats très inconstants.

Comme le montre la valeur des R*f*, la séparation de ces quatre constituants est excellente,

	Rf
Géraniol	0,48
Terpinéol	0,64
Linalol	0,75
Limonène	0,97

au moment de la pulvérisation de l'acide sulfurique concentré sur les plaques, ils ont tous une couleur rose orangée qui vire ensuite au vert pour le Terpinéol et le Limonène et au violet gris pour les deux autres (voir fig. et phot.).

b) CHROMATOGRAPHIE DES AROMATISANTS

Nous avons fait des essais à partir d'extraits éthéro-pétroliques à différentes concentrations en aromatisant afin de mettre en évidence, parmi les constituants du milieu, ceux qui, étant en plus grande quantité, seront les plus intéressants du point de vue recherche d'une aromatisation et aussi les réactifs les plus sensibles pour la révélation des chromatogrammes.

I. — Extrait de graines de Coriandre

Pour une concentration, au spot départ des chromatogrammes, de 7,5 mg de graines de Coriandre (0,15 cc d'un extrait à 50 g/l), l'acide sulfurique concentré ne révèle qu'une tache très nette rose orangée comme celle du Linalol et de R*f* 0,73.

Les réactions fluorescéine-Brome et à l'acide phosphomolybdotungstique ne donnent pas de résultat intéressant.

Pour une concentration double de la précédente, on a trois taches extrêmement nettes avec l'acide sulfurique, de R*f* :

0,50 : rose orangé au moment de la réaction, vire au violet en devenant très visible ;

0,75 : rose orangé ;

0,90 : jaune vert qui vire au brun marron (voir photo et schéma).

Le réactif de Bezssonoff, à cette ocncentration donne des résultats mais beaucoup moins nets que l'acide sulfurique concentré. Il en est de même pour le réactif fluorescéine-Brome.

II. — Extrait de Fleurs de Sureau

Pour une quantité d'extrait de 7,5 mg au spot de départ, l'acide sulfurique concentré ne révèle qu'une seule tache mais très intense, rouge violet et de R*f* 0,47.

Le réactif de Bezssonoff révèle cinq taches très nettes plus une traînée étalée sur 2,5 cm environ à partir du spot de départ. R*f* : 0,49, 0,57, 0,67, 0,84, 0,95 ; le spot 0,84 est marron brun, les autre gris bleu.

Pour une concentration double de la précédente, on obtient les mêmes taches révélées par les deux réactifs : acides sulfurique et phosphomolybdotungstique (voir schéma et photo).

Le réactif fluorescéine-Brome ne nous a pas donné de résultat intéressant.

En définitive, seules seront éventuellement intéressantes pour la recherche d'une aromatisation la tache orangée du Coriandre de R*f* 0,75 et correspondant vraisemblablement au Linalol et celle rose violet du Sureau, de R*f* 0,47. De plus l'acide sulfurique concentré paraît être un révélateur plus intéressant que l'acide phosphomolybdotungstique pour le Coriandre tout au moins ou que le réactif Fluorescéine-Brome.

Enfin, le Terpinéol qui serait d'après Oskar Simon la base du parfum de Sureau n'a pas été mis en évidence sur les chromatogrammes d'extrait à l'éther de Pétrole de cet aromatisant.

c) CHROMATOGRAPHIE DES VINS AROMATISÉS

Cette étude a été faite à partir des extraits de vins à l'éther de Pétrole dont nous avons déjà précisé les conditions d'obtention (voir p. 86).

Les vins sur lesquels nous avions recherché l'aromatisation par réactions colorées (voir p. 86 et tableau III) nous ont également servi pour cette étude chromatographique ainsi que différents grenaches vinifiés en VDN ou mistelles et aromatisés à raison de 0,5 g et 1 g de Coriandre par litre d'une part et de 5 g de fleurs de Sureau d'autre part.

Soit au total une dizaine de vins aromatisés.

Les extraits de tous les vins aromatisés au Coriandre ont donné des chromatogrammes qui, révélés à l'acide sulfurique concentré, présentaient une tache jaune vert aux faibles concentrations et rose orange aux fortes concentrations, correspondant à celle du Coriandre de R*f* 0,75, tache déjà nette dans les extraits non concentrés de vins aromatisés à 1 g de graines de Coriandre par litre, alors que les chromatogrammes des Gre-

naches naturels témoins ne présentaient aucune tache même pour les extraits concentrés cinq fois.

La différence entre les chromatogrammes des Grenaches témoins et des vins aromatisés est telle qu'il ne peut y avoir aucun doute possible sur l'aromatisation.

Signalons également que l'étude chromatographique d'un vin aromatisé à 1 g de Coriandre par litre, faite six mois après l'aromatisation nous a donné des résultats tout aussi positifs que les précédents.

Cette technique chromatographique permet donc de déceler l'aromatisation par le Coriandre même dans le cas où la fraude est de beaucoup antérieure à l'analyse. Il reste cependant à faire l'étude chromatographique des Muscats avant de tirer une conclusion définitive.

En ce qui concerne les vins aromatisés à la fleur de Sureau, nous avons eu des résultats moins heureux puisque les extraits concentrés dix fois ne présentaient pas, à la révélation sulfurique, la tache violet rose que nous avions observée dans les extraits de Sureau.

Dans les extraits concentrés vingt fois, il apparaît dans les témoins une tache rose violet de R*f* 0,44 qui pourrait se confondre avec celle du Sureau.

La révélation au réactif de Bezssonoff n'a donné également rien de plus dans les vins traités que dans les témoins. L'aromatisation par le Sureau ne paraît donc pas directement décelable par cette méthode chromatographique tout au moins en l'état actuel de la question mais, ainsi que nous le verrons plus loin, l'étude des témoins Muscat permet de tourner la difficulté en établissant avec de fortes probabilités, l'origine muscat ou non muscat du vin litigieux, car il existe en effet de très grandes différences entre les chromatogrammes de Muscat et ceux de Grenache.

d) CHROMATOGRAPHIE DES VINS NON AROMATISÉS (TÉMOINS)

Nous avons vu dans la première partie de ce travail consacrée à l'étude de l'aromatisation par réactions colorées que les éléments du bouquet, esters et alcools supérieurs, ne donnaient pas de réaction sulfurique colorée mais qu'il existe cependant dans les extraits éthéro-pétrolifères de VDN et de moûts stabilisés à l'alcool (mistelle) des substances ayant une réaction sulfurique colorée très nette. Ces substances, qui ont pour origine le fruit, doivent vraisemblablement donc, donner des taches sur les chromatogrammes révélés à l'acide sulfurique, taches qui peuvent être fort gênantes pour l'interprétation des chromatogrammes d'un vin suspecté d'aromatisation.

Il doit par conséquent être indispensable de faire l'étude de vins témoins offrant toute garantie, de naturels et d'origine.

Pour avoir une telle certitude sur l'authenticité des vins témoins

étudiés, nous les avons, pour la plupart, vinifiés nous-mêmes à partir de raisins que nous avions récoltés ou qui nous avaient été fournis par le Comité interprofessionnel des VDN et VDL à appellations contrôlées de Perpignan.

Ont été ainsi vinifiés les témoins suivants :

Cépage	Origine	Nature du vin
Muscats à petits grains de Frontignan	Pyrénées Orientales	VDN et mistelle
	Frontignan	VDN et mistelle
	Domaine de l'ENAM	VDN et mistelle
	Lunel	VDN
Terracina	Pyrénées Orientales	VDN et mistelle
	Frontignan	VDN et mistelle
Muscat d'Alexandrie	Pyrénées Orientales	VDN et mistelle
Grenache	Domaine de l'ENAM	VDN et mistelle
	Domaine de Lavalette	VDN et mistelle

Nous avons pu, enfin, nous procurer des VDN (1) certifiés authentiques (2) d'âges et d'origines différents :

Muscats de Frontignan de.....	1949		1953
Muscats du Haut Roussillon (Riversaltes et Salses)	1949		1953
Grenaches du Haut Roussillon (Rivesaltes)	1949	1950	1953
Muscats de Lunel		1951	1953

Nous avons donc fait au total, l'étude chromatographique des extraits éthéro-pétroliques de :

— 13 échantillons de Muscats de Frontignan vinifiés en VDN ou en mistelles soit de l'année, soit âgés de 2, 4 et 5 ans et d'origines différentes de Frontignan, Pyrénées Orientales, Lunel, domaine de l'École Nationale d'Agriculture de Montpellier (F. N. A. M.) ;

— 2 échantillons de Muscat d'Alexandrie, mistelles et VDN de l'année, provenance Pyrénées Orientales. ;

— 4 échantillons de Terracina, mistelles et VDN de l'année des Pyrénées Orientales et de Frontignan ;

— 7 échantillons de Grenache, mistelles et VDN, des domaines de l'E. N. A. M.(École et Lavalette) et des Pyrénées Orientales, de l'année et âgés de 2, 4 et 5 ans.

En tenant compte ainsi des facteurs les plus importants qui peuvent intervenir dans l'élaboration du parfum d'un vin : origine, donc milieu écologique ; année de récolte, donc conditions climatologiques ; vinification ; âge donc, conditions de maturation du vin, et en répétant pour un même cépage, les analyses sur un grand nombre d'échantillons, nous

(1) Fournis par MM. Perrier, Directeur de la Coopérative de Muscat de Frontignan, Doyard, Inspecteur de la Répression des fraudes et Noël Chevallier, Président du Syndicat des Muscats de Lunel, que nous remercions.

(2) Leur analyse chromatographique comparée à celle des témoins que nous avions vinifiés, a révélé qu'ils étaient bien tels.

croyons pouvoir être en mesure d'admettre que les résultats acquis, par l'absence même de cas aberrants, sont bien l'expression, non d'un accident, physiologique, technologique ou autre, mais d'un caractère propre à chacun des cépages étudiés.

Dans le tableau suivant, nous donnons les richesses en sucre et l'acidité des moûts des différents cépages avant leur vinification en mistelle (mutage à 16 p. 100 d'alcool) ou en VDN (additions de 10 p. 100 d'alcool dans les jus ayant déjà 6 p. 100 d'alcool acquis par fermentation).

TABLEAU IX

Cépages	Origine	Sucre g/l	D° puissance	Acidité totale g/l	État sanitaire de la vendange
Muscat à petits grains de Frontignan	Pyr. Orientales	237	13°9	4,8	Saine
	Frontignan	237	13°9	4.1	Saine
	Domaine de l'E. N. A. M.	197	11°5	5,8	Pourriture grise abondante
Muscat d'Alexandrie	Pyr. Orientales	194	11°3	4 g	Saine
Terracina	Pyr. Orientales	218	12°8	3,55	Début de pourriture
	Frontignan	216	12°6	2,65	Début de pourriture
Grenache.....	Domaine de l'E. N. A. M.	232	13°6	4,7	Très saine
	Domaine de la Valette	258	15°2	4,2	Saine

On peut voir que les muscats à petits grains de Frontignan, à l'exception de celui de l'E. N. A. M. que l'on ne doit d'ailleurs pas leur comparer, n'ont pas un degré suffisamment faible pour expliquer le manque de parfum qu'ils ont manifesté à l'analyse et à la dégustation.

Remarquons de plus que leurs degrés sont nettement supérieurs aux degrés des Terracina et du Muscat d'Alexandrie.

Étude des Muscats de Frontignan

Comme pour les vins aromatisés, cette étude a été faite à partir des extraits éthéro-pétroliques des vins.

En faisant varier les quantités d'extraits aux spots de départ des chromatogrammes, nous avons pu apprécier, dans une certaine mesure, les richesses relatives de ces extraits en substances positives aux révélateurs choisis.

Nous avons ainsi réalisé les concentrations en extraits suivantes aux spots de départ : 0,15 cc des extraits non concentrés et concentrés deux, cinq, dix et vingt fois.

Voici les résultats obtenus avec les 13 échantillons de Muscat de Frontignan (révélation des chromatogrammes à l'acide sulfurique).

Muscats de l'année

LUNEL. — 0,15 cc de l'extrait concentré 5 fois : 4 taches nettes sur les chromatogrammes. — Résultats identiques pour la mistelle et le VDN.

FRONTIGNAN. — 0,15 cc de l'extrait concentré 10 fois : 4 taches nettes sur les chromatogrammes.

PYRÉNÉES ORIENTALES. — 0,15 cc de l'extrait concentré 20 fois : 4 taches nettes. — Résultats identiques avec la mistelle et le VDN.

ÉCOLE NATIONALE D'AGRICULTURE DE MONTPELLIER. — 0,15 cc de l'extrait concentré 20 fois : 4 taches peu nettes. — Résultats identiques avec la mistelle et le VDN.

Muscats vieux

LUNEL 1953. — 0,15 cc de l'extrait non concentré. : 4 taches nettes.

LUNEL 1951, FRONTIGNAN 1953, PYRÉNÉES ORIENTALES 1953. — 0,15 cc de l'extrait concentré 5 fois : 4 taches.

FRONTIGNAN 1949, PYRÉNÉES ORIENTALES 1949. — 0,15 cc de l'extrait concentré 10 fois: 4 taches.

Ces résultats mettent en évidence un fait remarquable : *Sur les chromatogrammes de tous les échantillons de Muscat, mais pour des concentrations différentes suivant les échantillons il apparaît toujours les mêmes taches, au nombre de quatre, possédant des Rf identiques d'un échantillon à l'autre.*

Et ceci est un fait constant quel que soit l'âge, l'origine ou le mode de vinification du Muscat.

Tous les Muscats ont donc parmi les constituants de leur extrait éthéro-pétrolique, quatre composés ayant pour origine le raisin et non les phénomènes biochimiques liés à la fermentation alcoolique puisqu'on les trouve aussi bien dans les moûts stabilisés à l'alcool que dans les VDN, qui, comme nous le verrons plus loin, paraissent spécifiques au genre Muscat.

Si nous classons maintenant les échantillons d'après la concentration pour laquelle les quatre taches apparaissent, nous constatons que, d'une part, tous les Muscats de l'année, à l'exception du Lunel, se classent après les Muscats vieux et que parmi ceux-ci, les 1953 viennent avant les 1951 et les 1949 ; et que d'autre part, les Lunel, viennent avant les Frontignan, Pyrénées Orientales, et E. N. A. M.

Ainsi, l'intensité des taches paraît fonction de l'année et de l'origine écologique du VDN.

Enfin, remarque importante, ce classement correspond très sensiblement à celui établi par la dégustation. Le cas en particulier des Muscats de l'année qui ont été jugés très peu parfumés et dont les taches n'ont apparu sur les chromatogrammes que pour 0,15 cc des extraits concentrés 20 fois alors que pour les Muscats 1953, très parfumés, les taches ont apparu pour 0,15 cc des extraits non concentrés (Lunel) ou concentrés cinq fois ((Frontignan, Pyrénées Orientales) est particulièrement frappant à cet égard.

Il paraît donc y avoir une relation étroite entre le parfum et l'intensité des taches.

Si l'on admet cette relation entre le parfum et la concentration en substances que révèlent ces taches, nous aurons, par cette méthode chromatographique, un moyen d'appréciation relative du parfum d'un vin par rapport à un autre pour un cépage déterminé.

Après avoir acquis la certitude que les extraits de tous les Muscats étudiés donnaient des chromatogrammes présentant les mêmes taches, nous les avons réunis, réalisant ainsi un extrait moyen correspondant à un ensemble de Muscats d'origines, de qualités et d'âges très différents et avons fait l'étude chromatographique de ce nouvel extrait à différentes concentrations :

Quantité d'extrait au spot de départ	Chromatogrammes révélés à l'acide sulfurique concentré.
0,15 cc d'extrait non concentré	4 taches visibles par transparence
0,15 cc d'extrait concentré 2,5 fois	4 taches déjà nettes
0,15 cc d'extrait concentré 5 fois	4 taches très nettes.

Les R*f* de ces 4 taches révélées à l'acide sulfurique ont été déterminées sur 30 chromatogrammes pour des concentrations d'extrait au spot de départ de 0,15 cc des extraits concentrés dix et vingt fois.

Tache n° 1. — R*f* 0,48 : Les 4 taches sont jaunes vert puis rose
Tache n° 2. — R*f* 0,60 : orange au moment de la pulvérisation
Tache n° 3. — R*f* 0,74 : de l'acide sulfurique, elles virent ensuite
Tache n° 4. — R*f* 0,94 : au rose violet (tache 1), au jaune vert (tache 2), jaune orangé (tache 3), brun violet (tache 4).

La tache 3 jaune orange R*f* 0,74 est la plus intense, c'est d'ailleurs celle qui apparaît la première sur les chromatogrammes.

Elle offre une très grande ressemblance avec celle de R*f* 0,75 de l'extrait de Coriandre et celle de Linalol de même R*f* du mélange témoin, mais la chromatographie ne nous donne pas les moyens de déterminer avec certitude la nature exacte des substances correspondant à ces taches. Il faudrait pour cela faire l'étude chimique d'un volume suffisant d'extrait.

L'intensité des taches à la concentration de 0,15 cc de l'extrait concentré vingt fois correspond à peu de chose près à l'intensité des taches témoins à la concentration de 37 γ pour chaque constituant.

La concentration de chaque substance révélée sur les chromatogrammes de Muscat, serait donc de 300 γ à 500 γ par litre de Muscat. Soit, 2 mg environ pour les 4 substances réunies. Si on admet le chiffre de 200 mg/l, comme rendement approximatif en extrait obtenu par les solvants organiques type éther de Pétrole, pentane (chiffre de HENNIG 75 g pour 400 litres soit 180 mg/l).

Ces substances représenteraient environ, dans le cas du Muscat, 1p.100 de l'extrait total.

C'est peu en regard de l'importance qu'elles paraissent avoir dans l'intensité et la nature du parfum.

Ceci tendrait à prouver qu'elles ont une grande valeur aromatique et expliquerait qu'on n'ait pas mis nettement jusqu'ici, leur importance en évidence.

Soulignons que les chiffres donnés ne sont bien entendu, que des ordres de grandeur.

Le même calcul appliqué au Grenache donne une teneur en substances ayant une réaction colorée avec l'acide sulfurique concentré, de quelques centaines de γ par litre.

Le réactif de Bezssonoff révèle également les 4 taches mais beaucoup moins nettement que l'acide sulfurique ; avec le réactif fluorescéine-Brome nous n'avons pas obtenu de bons résultats.

En définitive, la « formule chromatographique » du Muscat de Frontignan est la suivante :

0,48 — 0,60 — 0,74 — 0,94

Les taches correspondant à ces R*f* apparaissent nettement sur les chromatogrammes pour une concentration au spot de départ de 0,15 cc de l'extrait concentré de 2 à 5 fois.

La chromatographie à deux dimensions aurait peut-être permis de déceler d'autres taches à partir des taches initiales ; nous ne l'avons pas envisagée jusqu'ici.

Étude du Muscat d'Alexandrie

L'étude similaire du moût stabilisé à l'alcool et du VDN de Muscat d'Alexandrie a donné des résultats très voisins des précédents puisque nous avons obtenu des taches très nettes sur les chromatogrammes pour 0,15 cc de l'extrait concentré cinq fois et que la formule chromatographique de ce Muscat, établie sur 25 chromatogrammes a été trouvée la suivante :

0,44 — 0,58 — 0,72 — 0,93

Les résultats ont été les mêmes pour la mistelle et le VDN.

La tache la plus intense est celle ayant un R*f* égal à 0,72, et elle est de couleur rose oranger comme celle du Frontignan.

Il y a donc une très grande analogie de formules chromatographiques sinon de parfum entre les deux Muscat de Frontignan et d'Alexandrie.

Étude du Terracina

1° PYRÉNÉES ORIENTALES :

0,15 cc de l'extrait non concentré : Aucune tache.

0,15 cc de l'extrait concentré 5 fois : Une tache presque au sommet du chromatogramme 0,92 mais à peine perceptible, très fugace.

0,15 cc de l'extrait concentré 20 fois : Une tache 0,92, plus une tache à peine visible à la révélation mais qui devient plus nette et rose violet après quelques minutes et de R/ 0,45 environ.

Mistelle et VDN même résultats.

2° DE FRONTIGNAN :

0,15 cc de l'extrait non concentré : Une très légère tache verte au sommet, très fugace ; chromatogramme pratiquement négatif.

0,15 cc de l'extrait concentré 5 fois : Une très légère tache verte au sommet, très fugace ; chromatogramme pratiquement négatif.

0,15 cc de l'extrait concentré 10 fois : Tache 0,95 plus nette.

0,15 de l'extrait concentré 20 fois : La tache 0,95 est bien nette plus une tache à peine visible 0,44 qui vire au rose violet plus une tache jaune vert, à peine visible même par transparence, qu'on devine plus qu'on ne la voit et qui ne s'observe même pas sur tous les chromatogrammes et de R/ mal défini, 0,75 environ.

Mistelle et VDN, même résultat.

Quelque soit l'origine ou le mode de vinification du vin, les résultats sont les mêmes.

La formule chromatographique du Terracina paraît donc être la suivante :

0,44	(0,75)	0,95

Pratiquement, une seule tache vraiment nette de Rf 0,95 pour une concentration de 0,15 cc de l'extrait concentré 20 fois au spot de départ.

Il existe donc une très grande différence entre les formules chromatographiques des Muscats et des Terracina et entre les concentrations pour lesquelles les taches apparaissent nettement sur les chromatogrammes.

Nous devons signaler cependant qu'en ce qui concerne les Terracina et Muscats d'Alexandrie nos résultats ne portent que sur un nombre limité d'échantillons, tous de la même année : 1954. Nous ne pouvons donc pas être aussi affirmatifs pour ces cépages que pour le Muscat à petits grains de Frontignan.

Étude des Grenaches

GRENACHES DU DOMAINE DE LA VALETTE (VDN ET MISTELLE) (révélation à l'acide sulfurique concentré).

0,15 cc de l'extrait non concentré : Chromatogrammes négatifs.

0,15 cc de l'extrait concentré 5 fois : Chromatogrammes négatifs.

0,15 cc de l'extrait concentré 10 fois : Légère tache Rf 0,95.

0,15 cc de l'extrait concentré 20 fois : Même tache plus une tache de R/ 0,45 très peu visible, n'apparaît même pas sur tous les chromatogrammes, vire au violet rose quelques minutes après la révélation.

GRENACHE DE L'E. N. A. M. (V. D. N.).

0,15 cc de l'extrait non concentré : Chromatogrammes négatif.

0,15 cc de l'extrait concentré 5 fois : Une tache 0,95 à peine visible.

0,15 cc de l'extrait concentré 10 fois : Une seule tache 0,95.

0,15 cc de l'extrait concentré 20 fois : Tache 0,95 nette plus une tache à peine visible 0,45, plus deux taches que l'on devine, par transparence seulement, dont nous n'avons pu définir les R/ à cause de leur manque de netteté mais qui se situent entre les deux précédentes.

GRENACHES PYRÉNÉES ORIENTALES : VDN 1950 1952 1953.

Les résultats ont été les mêmes pour les trois grenaches :

Apparition d'une tache 0,95 pour 0,15 cc de l'extrait concentré 5 fois.
Pour 0,15 cc de l'extrait concentré 20 fois, apparition d'une tache 0,45 très peu visible qui correspond à la tache de même R*f* des Grenaches jeunes ; la tache 0,95 est alors très nette mais son R*f* est difficile à déterminer car elle est étalée sur 1,5 cm à partir du sommet.

Ces deux taches comme celles des Muscats sont révélées par le réactif de BEZSSONOFF.

La formule chromatographique établie à partir d'un extrait résultant du mélange de tous les extraits de Grenache étudiés, sur une moyenne de 25 chromatogrammes et pour une concentration de 0,15 cc de l'extrait concentré 20 fois est la suivante :

(0,45) 0,93

La tache 0,45 est une tache secondaire peu visible dans la plupart des cas, par contre, la tache 0,93 est très nette.

En conclusion de cette étude des Témoins, si l'on compare les formules chromatographiques des Muscats et non Muscats.

Muscat de FRONTIGNAN. — 0,48-0,60-0,74-0,94, 4 taches nettes pour 0,15 cc de l'extrait concentré 2,5 fois.
Muscat d'ALEXANDRIE. — -0,44-0,58-0,72-0,93, 4 taches nettes pour 0,15 cc de l'extrait concentré 5 fois.
Terracina. — (0,44), (0,75), 0,95, une seule tache très nette pour 0,15 cc de l'extrait concentré 20 fois.
Grenache. — (0,45), 0,93, une seule tache très nette pour 0,15 cc de l'extrait concentré 20 fois.

On voit qu'il existe entre elles, de très grandes différences.

Les chromatogrammes des Muscats (Alexandrie et Frontignan présentent 4 taches extrêmement nettes même pour de faibles concentrations des extraits alors que les chromatogrammes de Terracina et de Grenache n'ont pratiquement, même pour des concentrations quatre à cinq fois supérieures aux précédentes, qu'une tache très nette située au sommet du chromatogramme, plus une tache secondaire, peu visible, avec parfois, entre les deux, mais très rarement, une ou deux taches à peine visibles même par transparence et de R*f* mal définis.

Il ne peut donc y avoir de confusion possible entre un chromatogramme de Grenache et de Muscat, on peut s'en convaincre d'ailleurs aisément en révélant côte à côte, des chromatogrammes de Grenache et de Muscat à la même concentration.

Pour rechercher l'aromatisation au Coriandre ou au Sureau, il suffira donc de comparer les chromatogrammes du vin litigieux à ceux d'un Muscat authentique, aux mêmes concentrations des extraits sur le spot de départ. Ainsi, les chromatogrammes présenteront :

Pour les Muscats témoins, les 4 taches caractéristiques de ce cépage, toutes très nettement révélées.

Pour le Grenache aromatisé au Coriandre, les 2 taches du Grenache, et entre celles-ci, la tache beaucoup plus nette du Coriandrol.

Pour le Grenache aromatisé au Sureau, les deux taches caractéristiques du Grenache seulement car aucun des éléments du Sureau ne sera révélé.

Dans ce cas, la méthode permet donc, non pas de déceler l'aromatisation, mais de déterminer la nature non muscat du vin étudié.

D'autres aromatisants peuvent évidemment être employés, qui, s'ils donnaient plusieurs taches sur les chromatogrammes rendraient l'interprétation des résultats très difficile ; on serait peut être alors amené à prendre un faux Muscat pour un Muscat authentique ce qui serait regrettable mais moins, certes, que l'inverse.

Nous n'avons pu envisager le cas de tous les aromatisants possibles mais parmi eux nous avons constaté que la racine d'Iris et l'Ambrette ne donnaient aucune tache.

On pourra donc reconnaître facilement l'origine Grenache des vins aromatisés par ces produits.

Dernière conclusion importante : Cette grande différence entre chromatogrammes de Grenaches et Muscats montre encore plus nettement que dans le cas des Muscats qu'il existe un rapport étroit entre l'intensité et la nature des tâches d'une part et l'intensité du parfum d'autre part. Ceci semble bien montrer que les substances révélées par l'acide sulfurique concentré sur les chromatogrammes rentrent pour une large part dans la constitution du fruité.

Nous verrons plus loin que ces substances, qui ont une relation si étroite avec le parfum, ne semblent pas être des esters. Ces résultats confirmeraient donc ceux de PEYNAUD qui avait mis en évidence dans l'extrait étheropétrolique des vins des substances insaponifiables concourant au parfum des vins. De plus, ces substances, comme d'ailleurs semblait l'admettre PEYNAUD, sont oxydables puisqu'elles réduisent le réactif de BEZSSONOF.

Origine et Nature des Substances révélées par l'acide sulfurique ; cette question a déjà été abordée dans la première partie de ce travail (voir page 88 et suivante).

Les résultats acquis ont été confirmés et précisés par l'étude chromatographique : ainsi, en ce qui concerne l'origine, nous avions observé que l'on trouvait dans les vins et moûts des substances donnant une réaction colorée avec l'acide sulfurique concentré. La chromatographie nous a montré que ces substances étaient bien les mêmes dans le moût et dans le vin (comparaison des chromatogrammes de Frontignan vini-

fié en VDN et mistelle). Elles ont donc pour origine, le fruit. De même l'étude chromatographique comparée des extraits de vins et des extraits de distillat (distillation faite en milieu acide et en milieu alcalin) a montré plus nettement encore que les réactions colorées, que ces substances sont volatiles et qu'il semble même s'en former au cours de la distillation en milieu acide.

En effet les chromatogrammes des extraits de distillat (distillation faite en milieu acide) présentent des taches beaucoup plus intenses que les chromatogrammes des extraits de distillat (distillation faite en milieu alcalin) et que les chromatogrammes des extraits des vins correspondants.

Il apparaît même de nouvelles taches sur les chromatogrammes d'extrait de distillat dans le cas du Grenache et du Terracina.

Ces substances semblent donc bien être des composés hydrolysables par distillation en milieu acide, hétérosides peut être.

De plus, il semblerait qu'elles soient plutôt sous forme hydrolysable dans le Grenache et le Terracina et sous forme libre dans les Muscats, car la distillation a une influence plus marquée sur les deux premiers cépages que sur le Muscat.

Enfin, la présence de taches sensiblement de même intensité sur les chromatogrammes des extraits de vin et des extraits de distillat (distillation faite en milieu alcalin), semblent prouver que les substances qu'elles révèlent font partie de l'insaponifiable de ces extraits. *Quoi qu'il en soit, il sera préférable dans l'étude du parfum des vins ou dans la recherche d'une aromatisation de faire l'extraction à l'éther de Pétrole directement sur le vin et non sur le distillat.*

La chromatographie enfin, des différents composés déjà étudiés du point de vue des réaction colorées, esters, alcools, aldéhydes, acétal, lactones, irone n'a donné des résultats vraiment positifs que pour les composés terpéniques et l'adéhyde cinnamique.

Parmi les autres, seuls, l'acétal, l'œnanthol et le furfural ont donné des taches, — mais à peine visibles bien que la concentration du produit au spot de départ ait été très élevée : 150 γ.

Nous pouvons donc conclure que les substances extraites des moûts ou des vins par l'éther de Pétrole et mises en évidence au moyen de l'acide sulfurique concentré par réaction colorée ou chromatographie,

1° ont pour origine la baie de raisin.

2° sont en partie libre, en partie sous forme de composés (hétérosides peut être) hydrolysables par distillation en milieu acide.

3° ne semblent être ni des esters, ni des alcools ou aldéhydes de la série grasse, ceux étudiés tout au moins mais, bien plutôt des composés de la série terpénique ou aromatique. Elles font d'ailleurs partie semble-t-il de l'insaponifiable des extraits.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux de PEYNAUD, comme nous

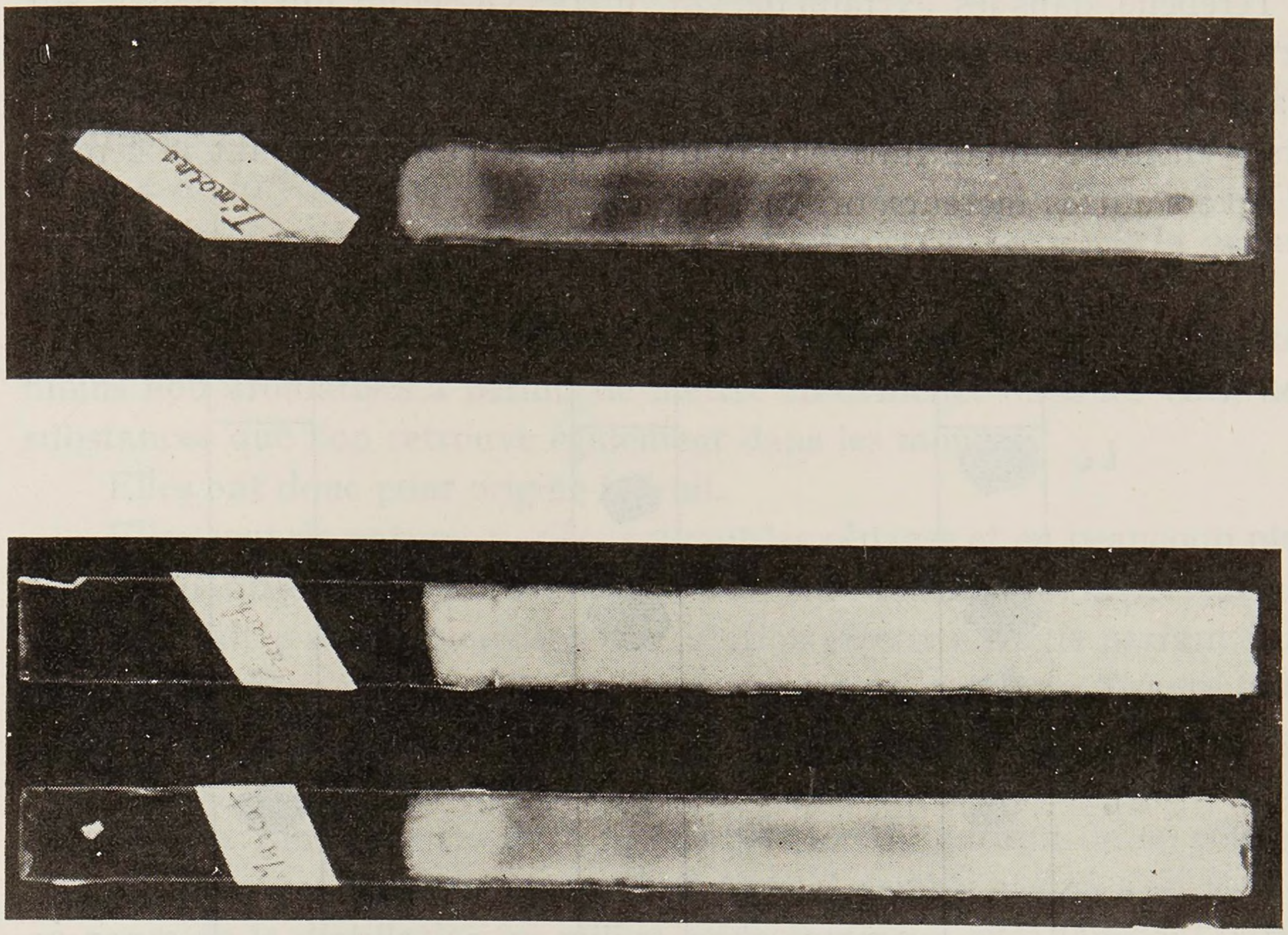


FIG. 1

l'avons déjà noté ; d'ORDONNEAU, signalant la présence d'un Terpène, le Térébène, dans les extraits de vin ; d'HENNIG enfin qui a signalé sur extrait de vin au pentane, un alcool terpénique et deux aldéhydes aromatiques. Mais comme le montre notre étude, ces composés varient qualitativement et quantitativement d'un vin à l'autre suivant le cépage et divers autres facteurs, origine, âge.

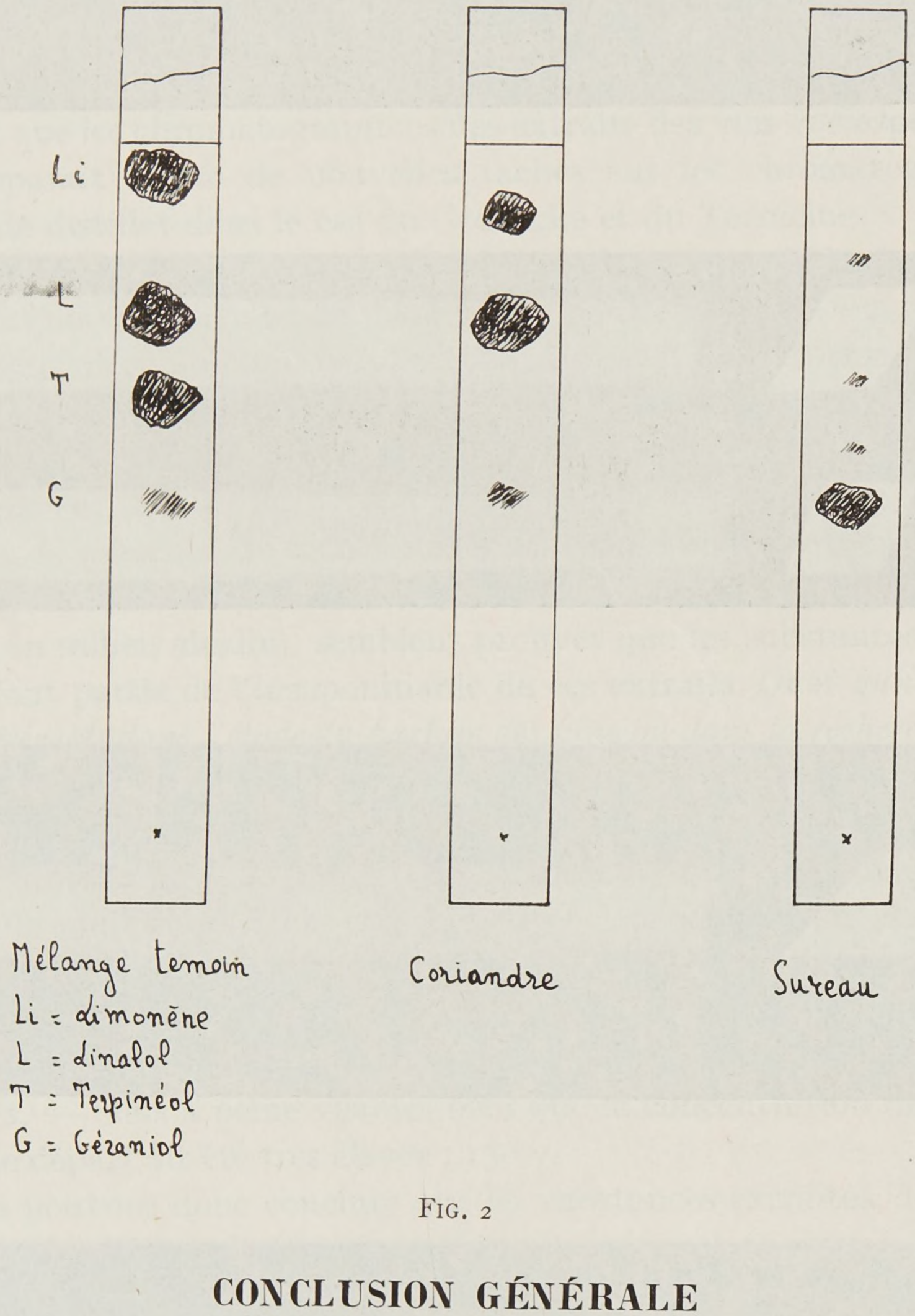


FIG. 2

CONCLUSION GÉNÉRALE

La recherche de l'aromatisation des vins par la graine de Coriandre et la fleur de Sureau a été faite sur leurs extraits à l'éther de Pétrole par réactions colorées (SALKOVSKI, EKKARD, BEZSSONOFF) et Chromatographie.

1° La technique des réactions colorées faites sur des extraits à l'éther de Pétrole de vins aromatisés ne nous a pas donné des résultats suffisamment nets pour déceler avec certitude une aromatisation par le Co-

riandre et le Sureau, même à des concentrations supérieures à celles où ces aromatisants sont habituellement utilisés.

Par contre, la méthode chromatographique, par la comparaison des chromatogrammes, révélés à l'acide sulfurique concentré, d'un témoin Muscat authentique et du vin litigieux, permet d'une part de déceler avec de fortes probabilités, l'aromatisation par le Coriandre et d'autre part, dans le cas de l'aromatisation au Sureau, de déterminer la nature non Muscat du vin étudié.

2° L'étude par réactions colorées et chromatographie de vins témoins non aromatisés à permis de mettre en évidence dans les vins, des substances que l'on retrouve également dans les moûts.

Elles ont donc pour origine le fruit.

Elles sont de natures variées suivant les cépages et en beaucoup plus grande quantité dans les Muscats que dans les Grenaches et les Terracina.

Il paraît y avoir également une relation étroite entre le parfum d'un vin et sa teneur en ces substances. Leur nature chimique exacte nous échappe mais les chromatogrammes de Muscat présentent une tache qui par son R*f* et sa coloration donnerait à penser que le Linalol ou un composé du Linalol entre dans la composition du parfum de ce cépage.

De plus, ces substances sont volatiles, il semble même s'en former au cours de la distillation en milieu acide comme si elles faisaient partie d'un composé hydrolysable.

Seraient-elles dans le fruit, soit libres, soit sous forme d'hétérosides ?

Elles ne paraissent pas appartenir aux produits liés aux processus biochimiques de la fermentation et du vieillissement tels que les esters, alcools, aldéhydes de la série grasse, ceux étudiés tout au moins, mais bien plutôt aux hydrocarbures terpéniques ou à des composés de la série aromatique.

Elles sont enfin insaponifiables et ne constituent qu'une faible part (quelques % au maximum) de l'extrait étheropétrolique total.

Mais il ne paraît pas contestable cependant que l'autre part de cet extrait, essentiellement constituée d'esters que cette méthode chromatographique ne permet pas de mettre en évidence avec les révélateurs que nous avons choisis, a également son rôle à jouer dans le parfum des vins ; en particulier, les esters d'acides gras et alcools supérieurs issus soit du fruit, soit du métabolisme de la levure.

Reçu pour publication le 10 mai 1955.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Liebig et Pelouze. — *Lieb. Annalen*, **19**, p. 241, 1836.
(2) (12) Ordonneau. — Alcools et eaux-de-vie . Étude chimique comparative, 1885.

(3) Dinsmoor Webb (A.). — Composition of a typical Grape Brandy Fusel oil. *Analyst. Chemistry*. Vol. 24, p. 1944-1952.
(4) (9) Hennig (K.) et Willforth (F.). — Vorratspflege und Lebensmittel forschung, nº 5-6, p. 181, et 7-9, p. 313, 1942. *Bull. Off. Int. Vin*, 158, p. 8, 1943.
(5) Peynaud (E.). — Etude sur les phénomènes d'estérification dans les vins. Rev. Viticulture, t. 87, pp. 362-382, 1937.
(6) Peynaud (E.) et Domerceq (S.). Etude sur les levures de la Gironde. *An. Techn.*, Inra, nº 4, p. 265, 1953.
(7) Power et Chesnut. *Ann. chem. Soc.*, t. 42, 1920.
(8) Power (F. B) *Am. Chem. Soc.*, t 43, p. 377, 1921.
(10) Traphagen et Burke. — *Am. Chem. Soc.*, t. 25, p. 242, 1903.
(12) Schmutz et Kayser. — Voir étude bibliographique de Legent-Fournès. *Bull. Off. int. Vin*, nº 163-166, p. 59, 1944.
(13) Austerweill (G.). — Quelques observations sur le parfum des vins. Industrie de la Parfumerie, vol. I, nº 6, p. 197, 1946.
(14) Naves et Mazuyer. Les parfums naturels, Essence concrète, Résinoïdes, huiles, pommades, p. 209.
(15) Nitschke (E.). — Recherche d'une aromatisation des vins blancs par « Coriandrum sativum ». Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène, Berne, vol. 42, fasc. I, p. 7, 1951.
(16) Maurel (A.). — Etude de l'aromatisation artificielle des vins doux naturels et des vins de liqueur. Compte rendu Académie Agriculture, nº 5, p. 207, 1954.
(17) Brunel (A.). — Traité de chimie végétale, p. 290. tome IV.
(18) Denigès. — Précis de Chimie Analytique. Tome II, p. 617.
(19) Guymon (James F.). — American Society of œnologists. Davis, California. July 26-27-28, p. 86, 1950.
(20) Kirchner (J. G.), Miller (J. M.), Keller (G. J.). — Séparation et identification de quelques terpènes par une nouvelle technique chromatographique. *Analytical chemistry*, vol. 23, nº 3, p. 430, 1951.

NOUVELLES RECHERCHES SUR LA MATURATION DU RAISIN DANS LE BORDELAIS

Années 1952, 1953 et 1954

PAR

E. PEYNAUD et **A. MAURIÉ**

Station agronomique et œnologique de Bordeaux

PLAN DU MÉMOIRE

Introduction.

I. — **Conditions météorologiques et phénologiques des années 1952, 1953 et 1954.**

II. — **Grosseur de la baie de raisin.**

III. — **Teneurs en sucre.**

IV. — **Taux d'acidité du raisin.**

V. — **Teneurs en matières minérales.**

VI. — **Teneurs en acide tartrique.**

VII. — **Teneurs en acide malique.**

VIII. — **Conclusions.**

Poursuivant nos études sur la maturation des raisins dans le Bordelais, qui ont donné lieu depuis 1938 à plusieurs publications (1), nous avons suivi par l'analyse l'évolution de la composition des raisins des récoltes 1952, 1953 et 1954. Nous nous sommes limités aux deux cépages rouges les plus importants en Gironde : le Cabernet-Sauvignon et le Merlot. L'étude des cépages blancs offre en effet des problèmes plus complexes, par l'intervention le plus souvent recherchée du *Botrytis cinerea*. CHARPENTIÉ a donné récemment un travail détaillé sur cette question (2).

Les prélèvements de raisins eurent lieu dans cinq vignobles, selon une technique plusieurs fois décrite, permettant d'obtenir un échantillon représentant exactement la moyenne de la parcelle de vigne étudiée.

Pour avoir des résultats comparables, nous avons suivi chaque année les mêmes rangées de vignes. Les vignobles d'expérience sont situés dans les trois principales régions de vins rouges fins : Médoc, Graves et Saint-Émilionnais, dans les communes de Pauillac, Margaux, Pessac ; deux se trouvent à Saint--Émilion sur des sols de nature différente. Il s'agit pour tous de crus classés, donnant des vins de qualité.

Voici quelques caractéristiques de ces vignobles.

Chateau L a Pauillac. — Vigne de Cabernet-Sauvignon âgée de 20 ans, plantée sur terre silico-argileuse, très graveleuse. L'analyse physique donne 38 p. 100 de cailloux et 80 p. 100 de sable siliceux par rapport à la terre fine, pour seulement 5,7 p. 100 d'humus.

Vigne de Merlot âgée de 40 ans, sur terre très siliceuse : 86 p. 100 de sable siliceux, pas de cailloux. Cette parcelle possède également très peu d'humus : 3,7 p. 100.

Ces sols sont extrêmement pauvres en éléments fertilisants : N total : 0,26 à 0,42 p. 1 000 ; P_2O_5 assimilable : 0,09 à 0,24 p. 1 000 ; K^3O assimilable : 0,06 à 0,09 p. 1 000. Depuis des années ils ne reçoivent aucune fumure. La végétation est faible ; la vigne est très basse, conduite sur un seul fil de fer, comme il est de règle en Médoc. Les rendements atteignent 30 hl/ha (moyenne pour les trois années).

Chateau P a Margaux. — Ce cru se trouve sur un type de sol silico-argileux, à petits cailloux, assez analogue au précédent. Les sols de graves du Médoc présentent tous d'ailleurs les mêmes caractéristiques de pauvreté en éléments fertilisants. Ici le sol reçoit une très légère fumure organique. La vigne est conduite de la même façon que dans le cru précédent. Les rendements demeurent faibles : moyenne des trois années : 30 hl/ha. La plantation des vignes de Merlot et de Cabernet-Sauvignon étudiées remonte à une quinzaine d'années. Elles ont été légèrement grêlées en juin 1953.

Chateau PC a Pessac. — Type de terre silico-argileuse, sablonneuse et peu graveleuse dans la pièce de Merlot, plus argileuse dans la pièce de Cabernet-Sauvignon, sur couche d'alios assez peu profonde. Extrêmement pauvre en éléments fertilisants, le sol reçoit une légère fumure minérale depuis 1952. La vigne est plus haute qu'en Médoc, palissée sur deux fils de fer. Le Merlot est âgé de 15 ans, le Cabernet-Sauvignon de 40 ans.

Les rendements sont très faibles : 23 hl seulement à l'hectare.

Chateau CF a Saint-Émilion. — Vignes sur sol argilo-calcaire, alcalin (pH 8,3), très chlorosant, donnant à l'analyse 48,8 p. 100 de cal-

caire total. Le sous-sol est constitué par du calcaire de carrière. Le sol en partie rapporté (le vignoble se trouve contre les anciens fossés de la ville) est très riche en acide phosphorique assimilable (1,84 p. 1 000) mais pauvre en azote (0,80 p. 1 000) et surtout en potasse (0,29 p. 1 000). Il ne reçoit pratiquement pas de fumure depuis des années. Les rendements sont cependant très bons et atteignent respectivement 38, 58 et 31 hl/ha pour 1952, 1953 et 1954, soit en moyenne le rendement maximum de l'appellation. Les vignes étudiées sont âgées de 20 ans environ ; elles sont conduites sur deux fils de fer.

Chateau F a Saint-Émilion. — Vignes sur sol silico-argileux, très nettement différent du précédent avec sous-sol de graves. Le sol est graveleux, 30 p. 100 de cailloux. Bien amendé, il reçoit annuellement une bonne fumure organique et minérale. Les vignes étudiées ont 15 ans environ. Le rendement à l'hectare se rapproche du maximum de l'appellation : 38 hl. La vigne est haute, peu rognée pour ne pas diminuer la surface foliaire.

Les raisins servant aux analyses étaient cueillis du début de la véraison à la maturité complète, d'abord tous les 10 jours, puis vers la fin de la maturation, toutes les semaines. Nous avons ainsi fait de 6 à 8 prélèvements successifs. On ramassait les raisins des cinq vignobles dans la même journée, la matinée en Médoc et à Pessac, l'après-midi à Saint-Émilion. On comptait un millier de grains au laboratoire ; ils étaient pesés, écrasés et pressés, toujours dans les mêmes conditions, à l'aide d'une presse à vis ; le volume du jus était mesuré. On déterminait le sucre densimétriquement et chimiquement, le pH et les éléments des bilans acidimétriques. Les teneurs de ces constituants furent rapportées au litre de moût et calculées pour 1 000 grains. Nous ne pouvons donner ici en détail les résultats des quelque 2 500 analyses ainsi effectuées. Nous en avons extrait quelques tableaux et graphiques.

Les buts poursuivis étaient, entre autres, les suivants : prévoir et fixer chaque année pour les régions intéressées la date de la maturité et du commencement des vendanges ; comparer la marche de la maturation dans des expositions et des microclimats variés et expliquer ainsi les différences constantes de composition des divers vins du Bordelais ; comparer la marche de la maturation d'une année à l'autre, en fonction des conditions météorologiques et expliquer ainsi les caractéristiques des différents millésimes.

Après un rappel des conditions météorologiques des trois années étudiées, nous suivrons les différents constituants chimiques analysés de la véraison à la complète maturité.

I. — CONDITIONS MÉTÉOROLOGIQUES ET PHÉNOLOGIQUES DES ANNÉES 1952, 1953 ET 1954

Les renseignements ci-dessous ont été tirés des observations météorologiques faites à l'observatoire de Bordeaux-Floirac. Dans un premier tableau, nous donnons les chiffres relatifs aux mois d'avril à octobre, comparés aux moyennes d'un grand nombre d'années. Les tableaux II et III groupent les observations par périodes végétatives, de la floraison à la véraison, et de la véraison à la maturité.

1952 se caractérise par un printemps et un début d'été secs et chauds ; la période de la véraison à la vendange a été beaucoup moins favorable et un mois de septembre très froid et assez pluvieux est venu un peu compromettre la qualité d'un millésime, cependant au-dessus de la moyenne, mais qui sans le mauvais temps des vendanges, s'annonçait exceptionnelle.

En 1953, la végétation accuse un léger retard sur l'année précédente, les mois de juin et de juillet sont moins chauds et l'abondance des pluies avant la véraison dépasse un peu la normale. Par contre, la période de maturation proprement dite a bénéficié d'un temps chaud et d'un mois d'août très sec, qui permirent d'atteindre un degré de maturation avancé et de réaliser un millésime supérieur au précédent.

Le retard de la végétation s'accuse encore en 1954. Les mois d'avril à juillet étant toujours plus froids que la moyenne, la période de la floraison à la véraison compte 8 jours de plus qu'en 1952. A cause de la date très tardive, et aussi à cause de la pourriture, les vendanges interviennent seulement 47 jours après la demi-véraison et en réalité dans beaucoup de cas avant qu'une maturité complète ne soit atteinte. La pluviosité, si l'on s'en tient à la comparaison des totaux des précipitations, rappelle les conditions de 1953. Finalement, 1954 fut une année froide, mais dans la période qui nous intéresse, nettement moins humide que la moyenne. La qualité honorable de cette récolte, tout au moins dans les grands vins rouges, peut surprendre. Assez paradoxalement la pourriture des raisins a été sans doute pour beaucoup de vins un facteur de qualité, grâce à une semaine de beau temps sec survenant après un début de pourriture ; ont vit les degrés monter souvent de plusieurs unités en quelques après-midi.

En rejoignant par des lignes les écarts avec la moyenne des températures et des hauteurs de pluie mensuelles, on peut tracer des graphiques assez représentatifs à la fois de l'année météorologique et de la valeur du millésime (voir fig. 1, 2 et 3) (1).

(1) Nous avons emprunté ce mode d'expression à M. MERMILLOD, régisseur d'un important cru de Pauillac, et nous le remercions, en outre, des précieuses indications qu'il a bien voulu nous communiquer sur l'évolution du vignoble au cours des années d'expérience.

Tableau I

Observations météorologiques des années 1952, 1953 et 1954
Bordeaux-Floirac

		1952	1953	1954	Moyennes d'un grand nombre d'années
Avril	Température moyenne	13°00	12°10	10°98	11°34
	Total des pluies	38,8	70,9	46,7	62,9
	Jours de pluie	11	20	8	17
Mai	Température moyenne	16°87	17°01	14°05	15°00
	Jours grande chaleur	1	4	0	1
	Total des pluies	37,7	18,0	41,0	67,1
	Jours de pluie	10	9	11	17
Juin	Température moyenne	20°56	16°52	17°17	18°05
	Jours grande chaleur	10	0	1	3
	Total des pluies	44,4	95,0	20,3	63,3
	Jours de pluie	8	17	9	15
Juillet	Température moyenne	20°64	18°70	17°70	20°00
	Jours grande chaleur	11	2	2	7
	Total des pluies	27,5	50,1	42,0	49,1
	Jours de pluie	9	12	16	13
Août	Température moyenne	20°59	21°35	18°23	20°17
	Jours grande chaleur	7	15	3	8
	Total des pluies	63,1	13,8	97,9	51,6
	Jours de pluie	11	15	19	13
Septembre	Température moyenne	14°44	17°93	17°01	17°91
	Jours grande chaleur	0	6	0	3
	Total des pluies	75,5	65,8	63,1	62,7
	Jours de pluie	22	11	16	14
Octobre	Température moyenne	13°61	13°62	14°52	13°12
	Total des pluies	141,5	62,1	57,4	81,4
	Jours de pluie	22	14	9	19
Totaux et moyennes.	Température moyenne	16°86	16°74	15°66	16°51
	Jours grande chaleur	29	27	6	22
	Total des pluies	428	376	368	438
	Jours de pluie	83	98	88	108

Tableau II

Conditions météorologiques de la floraison à la véraison

	Date de la demi-floraison	Date de la demi-véraison	Nombre de jours	Somme des températures moyennes	Jours de grande chaleur	Total des pluies	Jours de pluie
1952	27 mai	3 août	68	1 386°	21	76	19
1953	2 juin	14 août	73	1 341°	10	145	30
1954	13 juin	28 août	76	1 351°	5	145	38

Tableau III

Conditions météorologiques de la véraison à la maturité

	Date de la demi-véraison	Date de la maturité (1)	Nombre de jours	Somme des températures moyennes	Jours de grande chaleur	Total des pluies	Jours de pluie
1952	3 août	22 sept.	50	894°	7	110	27
1953	14 août	5 oct.	52	969°	12	104	19
1954	28 août	14 oct.	47	750°	0	101	23

(1) Les dates de la demi-floraison et de la maturité sont celles du Merlot au Château L. à Pauillac.

Dates de la demi-véraison. — La véraison s'étend au vignoble sur une période de 12 à 18 jours. Pour permettre des comparaisons plus précises, nous déterminons la date de la demi-véraison, qui indique le moment où la moitié des baies de raisin ont changé de couleur. A chaque

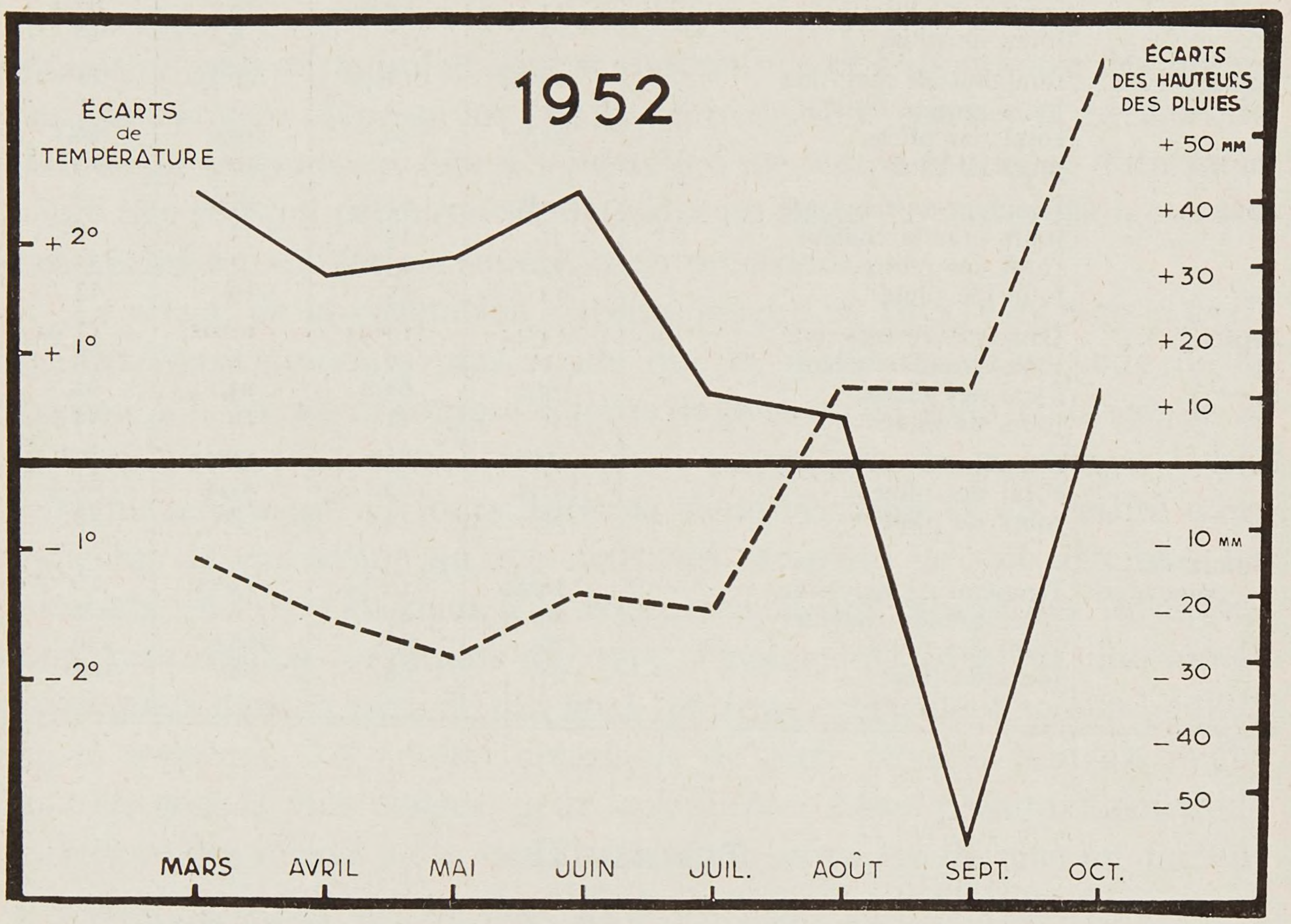


Fig. 1. — Ecarts avec la normale des températures mensuelles et des hauteurs de pluie mensuelles. Les températures sont réunies par des traits pleins, les hauteurs de pluie par des tirets.

prélèvement de raisins nous avons compté les grains vérés et les grains non vérés, et calculé le pourcentage de véraison. En interpolant on obtient la date pour laquelle 50 p. 100 des raisins sont colorés. D'autre part, connaissant la constitution du raisin à certains stades de la véraison, nous l'avons calculée graphiquement à la demi-véraison. Les tableaux IV et V ont été établis de cette façon. Le premier indique la composition

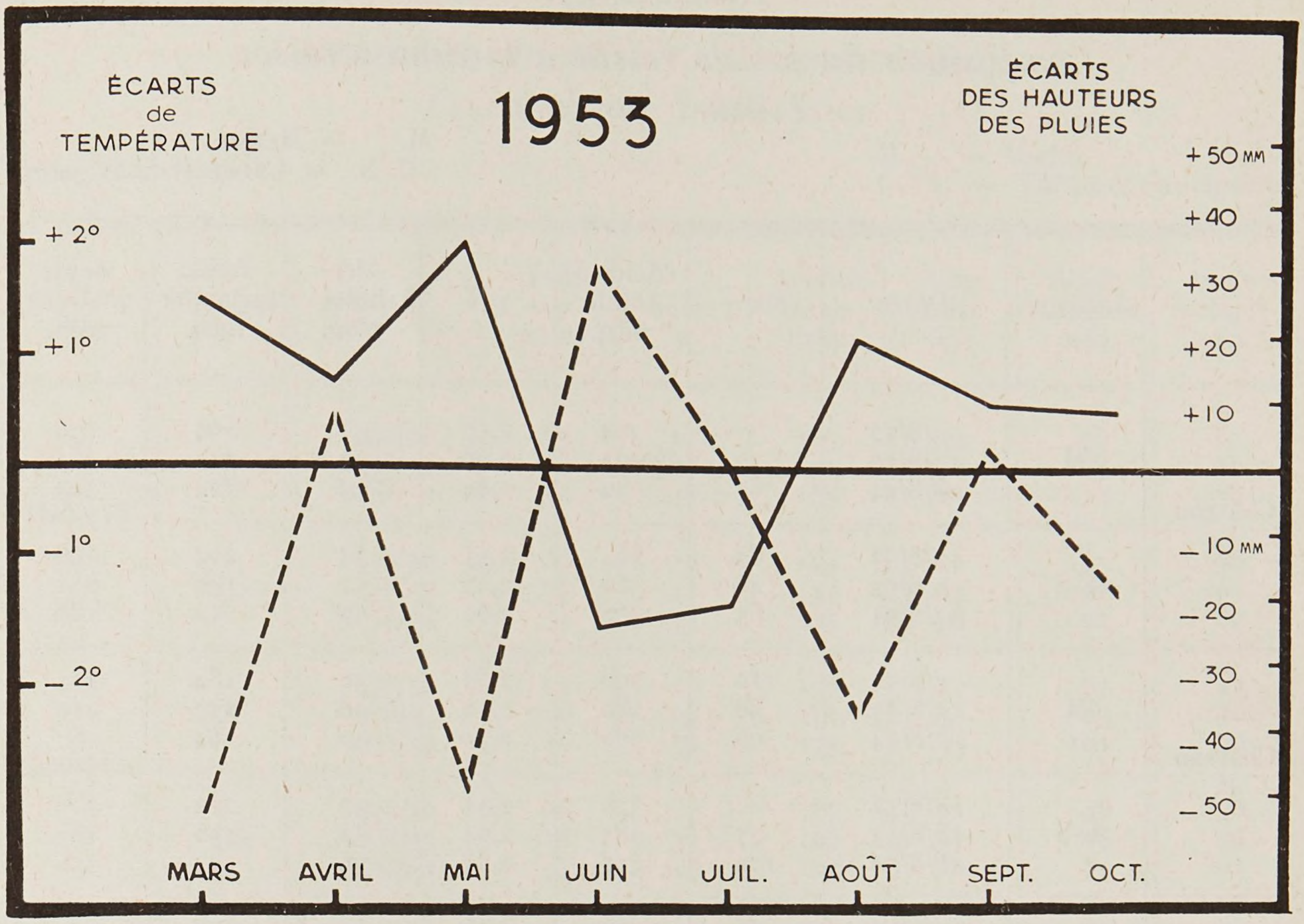

ÉCARTS
de
TEMPÉRATURE
1953
ÉCARTS
DES HAUTEURS
DES PLUIES
+ 2°
+ 1°
— 1°
— 2°
+ 50 MM
+ 40
+ 30
+ 20
+ 10
— 10 MM
— 20
— 30
— 40
— 50
MARS
AVRIL
MAI
JUIN
JUIL.
AOÛT
SEPT.
OCT.

FIG. 2.

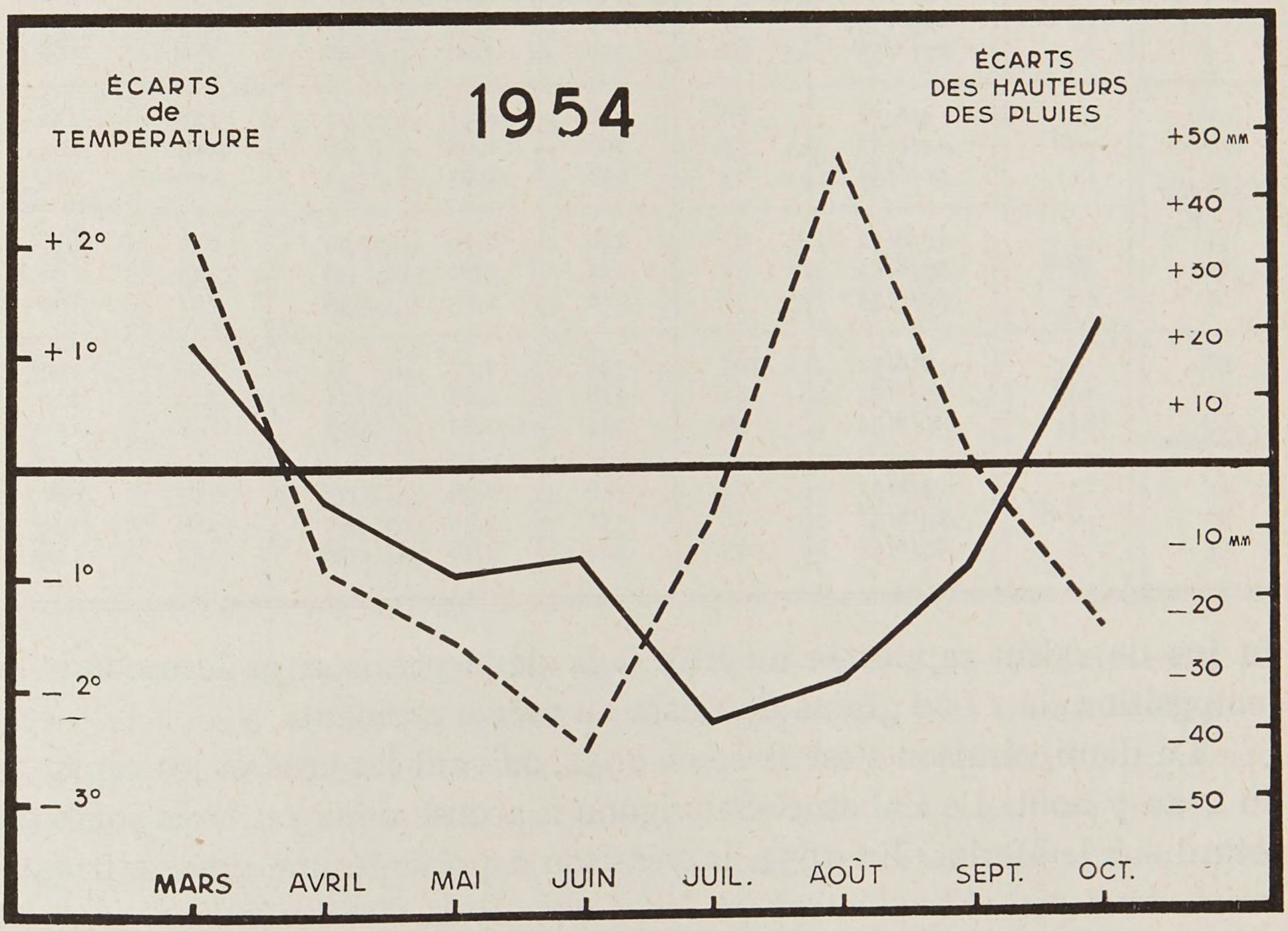

ÉCARTS
de
TEMPÉRATURE
1954
ÉCARTS
DES HAUTEURS
DES PLUIES
+ 2°
+ 1°
— 1°
— 2°
— 3°
+ 50 MM
+ 40
+ 30
+ 20
+ 10
— 10 MM
— 20
— 30
— 40
— 50
MARS
AVRIL
MAI
JUIN
JUIL.
AOÛT
SEPT.
OCT.

FIG. 3.

Tableau IV

Composition du jus de raisin à la demi-véraison
Teneurs par litre

M. = Merlot.
C. S. = Cabernet-Sauvignon.

	Cépages	Dates	Sucre	Acidité totale méq.	pH	Alcalinité méq.	Acide tartrique méq.	Acide malique méq.
Château L.	M	3/8/52	77	364	2,50	37	204	196
		17/8/53	33	264	2,66	49	140	164
		28/8/54	87	330	2,64	43	224	162
	C-S	3/8/52	85	364	2,57	34	214	196
		9/8/53	49	360	2,56	52	140	260
		27/8/54	85	360	2,60	40	212	188
Château P.	M	2/8/52	110	290	2,65	30	184	117
		12/8/53	50	280	2,70	48	152	210
		27/8/54	96	300	2,71	40	164	167
	C-S	4/8/52	—	370	2,44	37	212	220
		18/8/53	77	284	2,64	42	150	185
		26/8/54	100	310	2,63	36	194	156
Château P. C.	M	3/8/52	73	365	2,62	34	211	194
		15/8/53	44	310	2,68	43	144	206
		28/8/54	90	307	2,65	39	198	154
	C-S	7/8/52	96	340	2,60	41	196	190
		18/8/53	67	316	2,65	40	115	250
		27/8/53	82	350	2,64	40	210	186
Château C. F.	M	4/8/52	86	340	2,51	32	238	132
		17/8/53	57	296	2,68	46	184	164
		30/8/54	83	288	2,65	35	210	110
	C-S	7/8/52	92	340	2,50	34	217	146
		24/8/53	91	232	2,60	38	154	128
		30/8/54	91	318	2,65	36	192	160
Château F.	M	2/8/52	105	334	2,57	33	218	156
		9/8/53	42	318	2,62	41	156	220
		26/8/54	86	294	2,62	36	188	156
	C-S	4/8/52	74	380	2,39	33	214	200
		13/8/53	36	332	2,70	45	188	194
		27/8/54	95	302	2,56	38	194	158

du jus de raisin rapportée au litre à la demi-véraison et le second, la composition de 1 000 grains de raisin au même moment.

La demi-véraison s'est fixée en 1952, suivant les crus et les cépages, du 2 au 7 août. Le Cabernet-Sauvignon a accusé deux ou trois jours de retard sur le Merlot. En 1953, la véraison a présenté une grande irrégularité dans son déroulement et les dates de la demi-véraison se sont étalées dans les vignobles étudiés du 9 au 24 août. Le Cabernet-Sauvignon a huit jours d'avance sur le Merlot à Pauillac, alors qu'ailleurs il a de

Tableau V

Composition du raisin à la demi-véraison
Teneurs pour 1 000 baies

M. = Merlot.
C. S. = Cabernet-Sauvignon.

	Cépages	Dates	Poids 100 grains	Sucre g	Acidité totale méq.	Alcalinité méq.	Acide tartrique méq.	Acide malique méq.
Château I.	M	3/8/52	65	27	124	13	70	67
		17/8/53	88	34	130	24	68	80
		28/8/54	85	48	165	22	112	78
	C-S	3/8/52	62	29	124	12	75	68
		9/8/53	67	21	147	17	57	103
		27/8/54	74	43	155	18	92	82
Château P.	M	2/8/52	67	40	100	11	67	42
		12/8/53	108	36	182	32	93	130
		27/8/54	96	58	175	24	102	98
	C-S	4/8/52	48	—	87	11	46	38
		18/8/53	66	32	106	17	58	69
		26/8/54	71	45	133	16	85	64
Château P. C.	M	3/8/52	80	29	150	14	88	81
		15/8/53	86	26	173	24	80	115
		28/8/54	78	50	162	21	104	81
	C-S	7/8/52	64	24	128	15	73	70
		18/8/53	64	26	117	15	43	90
		27/8/54	80	43	180	20	108	95
Château C. F.	M	4/8/52	65	31	112	11	80	43
		17/8/53	73	28	115	20	75	65
		30/8/54	81	40	132	19	114	49
	C-S	7/8/52	56	27	102	10	62	44
		24/8/53	66	47	121	20	80	67
		30/8/54	64	27	101	12	69	50
Château F.	M	2/8/52	90	56	154	16	107	69
		9/8/53	98	27	198	27	95	124
		26/8/54	102	55	185	23	118	98
	C-S	4/8/52	52	26	107	10	65	53
		13/8/53	57	12	119	16	64	66
		27/8/54	57	33	105	13	67	56

trois à sept jours de retard. En 1954, la demi-véraison a été fixée entre le 26 et le 30 août et partout le Cabernet-Sauvignon a véré avant le Merlot.

La véraison était donc décalée en moyenne de 11 jours en 1953 sur l'année 1952, et en 1954 de 12 jours sur l'année 1953, soit 23 jours sur 1952. Ces retards s'expliquent en partie par les dates de floraison plus tardives de 6 jours en 1953 et de 17 jours en 1954 par rapport à 1952. Ils n'ont fait que s'accentuer par la suite à cause des mauvaises conditions météorologiques des mois de juin et de juillet 1953 et 1954.

Les températures des mois de mars, avril et mai de ces trois années expliquent assez bien les différences dans les dates de floraison : en 1952 la température moyenne de ces trois mois est supérieure de 2° à la normale, en 1953 elle est supérieure de 1° 4, mais en 1954, elle est légèrement inférieure de 0° 06.

Tableau VI

Composition du jus de raisin à la maturité
Teneurs par litre de moût

M. = Merlot.
C. S. = Cabernet-Sauvignon.

	Cépages	Dates	Sucre g	Acidité totale méq.	pH	Alcalinité cendres méq.	Acide tartrique méq.	Acide malique méq.
Château L.	M	22/ 9/52	228	74	3,52	56	95	31
		5/10/53	236	79	3,30	60	109	15
		14/10/54	220	108	3,15	48	141	18
	C-S	29/ 9/52	210	112	3,38	48	108	44
		5/10/53	212	103	3,22	54	112	50
		14/10/54	205	112	3,10	48	126	31
Château P.	M	15/ 9/52	208	60	3,60	60	91	32
		28/ 9/53	188	88	3,35	61	110	30
		7/10/54	220	100	3,29	44	121	27
	C-S	19/ 9/52	200	96	3,30	57	116	45
		28/ 9/53	192	100	3,20	50	118	26
		7/10/54	202	112	3,15	41	128	24
Château P. C.	M	15/ 9/52	190	100	3,30	57	97	48
		5/10/53	192	80	3,50	55	99	36
		7/10/54	202	116	3,20	43	126	33
	C-S	22/ 9/52	188	116	3,40	60	116	58
		5/10/53	196	104	3,21	57	113	45
		7/10/54	196	128	3,22	43	118	45
Château C. F.	M	18/ 9/52	220	90	3,40	62	115	45
		5/10/53	208	88	3,38	57	107	41
		14/10/54	212	100	3,15	45	128	20
	C-S	18/ 9/52	222	102	3,39	60	121	34
		5/10/53	204	96	3,10	55	108	45
		14/10/54	218	92	3,20	43	125	15
Château F.	M	18/ 9/52	212	74	3,61	48	97	34
		28/ 9/53	196	84	3,30	59	107	38
		14/10/54	228	84	3,25	48	120	13
	C-S	18/ 9/52	226	92	3,40	51	108	45
		5/10/53	192	92	3,25	58	106	43
		14/10/54	220	100	3,20	45	124	20

Dates de la maturité. — L'état de maturité du raisin est défini ici comme la maturité industrielle. Le dernier prélèvement était effectué

au moment des vendanges. Précisons que dans les vignobles étudiés les vendanges étaient retardées le plus possible pour atteindre l'optimum de maturité, en tenant compte précisément des renseignements fournis par le contrôle hebdomadaire. Les tableaux VI et VII groupent les résultats des dernières analyses.

Les vendanges des pièces d'expérience furent effectuées en 1952 du 15 au 22 septembre pour le Merlot, du 18 au 29 pour le Cabernet-

TABLEAU VII

Composition du raisin à la maturité
Teneurs pour 1 000 baies

M. = Merlot.
C. S. = Cabernet-Sauvignon.

	Cépages	Dates	Poids 100 grains	Sucre g	Acidité totale méq.	Alcalinité méq.	Acide tartrique méq.	Acide malique méq.
Château L.	M	22/ 9/52	124	169	54	41	70	23
		5/10/53	122	183	61	46	85	12
		14/10/54	130	168	82	37	108	14
	C-S	29/ 9/52	105	129	69	29	66	27
		7/10/53	84	107	52	27	56	15
		16/10/54	103	120	65	28	74	18
Château P.	M	15/ 9/52	106	123	36	35	54	19
		28/ 9/53	138	160	74	52	93	25
		7/10/54	123	165	75	53	91	20
	C-S	19/9 /52	88	89	43	25	52	20
		30/ 9/53	89	108	56	28	66	15
		9/10/54	99	112	62	23	71	13
Château P. C.	M	15/ 9/52	112	110	69	39	66	33
		5/10/53	132	156	65	45	81	29
		7/10/54	133	158	91	34	98	26
	C-S	22/ 9/52	101	86	68	35	68	34
		6/10/53	90	100	53	29	58	23
		8/10/54	116	131	86	29	79	30
Château C. F.	M	18/ 9/52	112	118	48	33	62	24
		5/10/53	113	152	64	41	78	30
		14/10/54	114	142	67	30	85	13
	C-S	18/ 9/52	103	111	51	30	60	17
		7/10/53	82	108	50	29	57	24
		16/10/54	113	140	59	27	80	10
Château F.	M	18/ 9/52	153	192	66	43	87	30
		28/ 9/53	139	174	74	52	95	33
		14/10/54	140	160	59	34	84	9
	C-S	18/ 9/52	95	124	50	28	58	24
		5/10/53	78	90	43	27	49	20
		14/10/54	88	113	51	23	64	10

Tableau VIII

Étude de la maturation du raisin Merlot

Château L., Pauillac Teneurs par litre de moût

Dates	Densité Baumé	Sucre	pH	Acidité totale	Alcalinité	NH^4	*Somme des cations*	Acide tartrique	Acide malique	Acide citrique	PO^4	*Somme des anions*
						1952						
28/7.....	—	26	2,32	486	36	4,4	*527*	246	266	3,2	1,0	*516*
7/8.....	6°9	113	2,62	280	38	4,6	*323*	176	150	2,4	1,5	*330*
18/8.....	9°8	172	2,70	144	31	4,4	*180*	112	74	1,8	1,0	*189*
28/8.....	11°7	220	2,91	114	35	3,2	*152*	105	55	1,7	1,5	*163*
8/9.....	11°9	220	3,30	95	39	2,2	*139*	100	42	1,3	2,1	*145*
15/9.....	12°3	228	3,40	66	49	2,4	*121*	92	34	1,3	3,2	*130*
22/9.....	12°2	228	3,52	74	56	2,2	*132*	95	31	1,0	3,7	*131*
						1953						
4/8.....	4°1	31	2,30	496	40	9,0	*545*	169	362	5,0	2,1	*538*
13/8.....	6°1	38	2,58	316	48	5,0	*369*	164	192	3,8	2,1	*362*
24/8.....	9°1	125	2,80	184	51	3,2	*238*	102	116	3,1	4,2	*225*
3/9.....	10°8	185	3,08	116	64	2,4	*182*	117	70	3,6	2,1	*193*
14/9.....	11°6	212	3,25	100	65	2,4	*167*	111	44	1,5	2,1	*159*
21/9.....	11°9	216	3,32	80	61	2,2	*143*	118	27	1,6	1,0	*148*
28/9.....	12°4	216	3,30	72	61	2,0	*135*	100	30	1,9	3,1	*135*
5/10.....	12°8	236	3,30	79	60	0,2	*139*	109	15	2,4	4,2	*131*
						1954						
23/8.....	4°9	45	2,50	424	43	10,8	*478*	259	221	6,1	1,1	*487*
2/9.....	8°5	128	2,78	238	43	7,2	*288*	182	96	3,2	2,1	*283*
13/9.....	10°0	164	2,92	164	44	4,8	*213*	143	59	1,6	3,6	*207*
22/9.....	11°0	200	3,02	140	43	3,6	*187*	127	48	2,6	3,1	*181*
30/9.....	11°5	210	3,10	112	47	2,4	*161*	134	20	1,4	2,1	*157*
7/10.....	11°6	210	3,20	112	48	2,4	*162*	138	24	2,1	2,0	*166*
14/10.....	12°1	220	3,15	108	48	4,6	*161*	141	18	1,7	1,5	*162*

Tableau IX

Étude de la maturation du raisin Cabernet-Sauvignon

Château L. Pauillac. Teneurs par litre de moût

Dates	Densité Baumé	Sucre	pH	Acidité totale	Alcalinité	NH_4	*Somme des cations*	Acide tartrique	Acide malique	Acide citrique	PO_4	*Somme des anions*
						1952						
28/7.....	—	35	2,40	504	31	13,6	*551*	247	—	3,6	0,5	—
7/8.....	7°2	110	2,65	294	36	10,8	*341*	198	140	4,6	0,8	*343*
18/8.....	9°2	143	2,71	174	33	7,6	*214*	109	94	2,8	1,5	*207*
28/8.....	11°1	196	2,90	132	34	6,8	*173*	122	55	2,4	1,0	*180*
8/9.....	11°4	210	3,25	94	44	6,0	*144*	107	45	2,0	1,0	*155*
15/9.....	11°8	200	3,30	84	48	3,6	*136*	98	46	1,9	3,1	*143*
22/9.....	12°0	218	3,29	105	48	4,0	*157*	106	40	1,8	3,1	*151*
29/9.....	12°0	210	3,38	112	48	4,0	*164*	108	44	1,7	3,6	*157*
						1953						
4/8.....	5°3	48	2,32	476	38	16	*530*	143	354	7,1	1,0	*505*
13/8.....	7°4	50	2,70	276	46	8	*330*	137	180	4,7	3,1	*325*
24/8.....	8°6	129	2,78	196	45	10	*251*	107	122	5,3	4,2	*238*
3/9.....	10°7	182	3,00	140	56	8	*204*	130	68	3,1	2,1	*203*
14/9.....	11°3	196	3,20	116	61	8	*185*	114	64	3,7	2,1	*186*
21/9.....	11°4	196	3,30	100	62	6	*168*	116	48	3,2	1,5	*169*
28/9.....	12°0	204	3,15	100	57	6	*163*	107	49	3,3	2,1	*161*
5/10.....	12°5	212	3,22	103	54	6	*163*	112	50	2,6	2,1	*167*
						1954						
23/8.....	5°9	64	2,48	432	40	18,8	*491*	252	230	5,4	1,1	*488*
2/9.....	8°0	116	2,80	252	40	10,8	*303*	150	128	4,2	1,5	*284*
13/9.....	9°3	140	2,95	176	44	7,2	*227*	137	82	2,6	1,5	*223*
22/9.....	10°3	181	3,00	164	40	8,0	*212*	124	76	3,0	2,0	*205*
30/9.....	10°5	188	3,05	136	44	6,4	*186*	131	49	2,5	2,6	*185*
7/10.....	11°1	202	3,15	132	41	6,4	*179*	132	38	2,7	1,5	*174*
14/10.....	11°3	205	3,10	112	48	6,0	*166*	126	31	2,9	1,5	*161*

Sauvignon. En 1953, le Merlot accuse 13 jours de retard et le Cabernet-Sauvignon 10 jours, sur les dates de 1952. En 1954, le retard se chiffre à une vingtaine de jours. Le retard de la véraison n'a pas été rattrapé. C'est en 1953 que d'une façon générale le délai a été le plus long entre la véraison et la maturité, ainsi que le montre le tableau ci-après qui rassemble les chiffres moyens pour les cinq crus.

Années	Merlot	Cabernet-Sauvignon
1952	46 jours	47 jours
1953	50 »	50 »
1954	45 »	47 »

Ces délais varient de même d'un cru à un autre, beaucoup plus sans doute parce que, dans quelques crus, les producteurs prennent davantage le risque de ramasser très mûr, qu'à cause de différences végétatives.

On pourrait penser que la constance relative de ces chiffres moyens

TABLEAU X

Evolution des constituants chimiques du raisin Merlot

Château L., Pauillac
Teneurs pour 1 000 grains de raisin

Dates	Poids moyen 100 grains	Sucre g	Acidité totale	Alcalinité	Acide tartrique	Acide malique	Acide citrique
			1952				
28/7	59	8,3	158	11,7	79	85	1,0
7/8	69	41	102	14,0	64	55	0,9
18/8	94	97	81	17,7	63	41	1,0
28/8	122	149	77	23,7	71	37	1,1
8/9	135	157	68	28,0	71	30	0,9
15/9	138	155	45	33,2	69	23	0,9
22/9	124	169	54	41,0	70	23	0,7
			1953				
4/8	64	11	178	14,4	61	131	1,8
13/8	80	18	151	22,8	78	92	1,8
24/8	102	62	92	25,5	51	58	1,5
3/9	119	123	77	33,0	78	46	2,3
14/9	118	160	75	49,3	84	33	1,1
21/9	130	168	61	47,0	90	21	1,2
28/9	123	164	55	46,5	76	23	1,4
5/10	122	183	61	46,5	85	12	1,9
			1954				
23/8	73	20	188	18,1	115	98	2,7
2/9	96	77	143	25,8	109	58	1,9
13/9	95	117	117	31,5	102	43	1,1
22/9	104	154	108	33,2	98	37	2,0
30/9	131	155	83	34,8	99	15	1,0
7/10	140	164	87	37,5	108	19	1,6
14/10	130	168	82	36,8	108	14	1,3

permet de calculer à quelques jours près la date des vendanges assez longtemps à l'avance, connaissant la date de la demi-véraison. La durée de la maturation ainsi définie est, en moyenne, de 40 à 50 jours. En réalité on observe qu'elle a varié dans nos documents de 41 à 60 jours et, en conséquence, la prévision du jour des vendanges dans un cas particulier reste soumise à une certaine imprécision. Un cycle végétatif n'a jamais une durée absolument fixe.

Pour obtenir une image de la cinétique de la maturation, entre la véraison et la maturité, nous avons suivi par des analyses détaillées, l'évolution du raisin. Des bilans acidimétriques furent ainsi établis aux divers stades de la maturation, permettant de suivre la marche du phénomène. Nous donnons dans les tableaux VIII, IX, X et XI, par simplification pour un seul cru, un exemple des documents rassemblés pour les cinq vignobles.

Tableau XI

Evolution des constituants chimiques du raisin Cabernet-Sauvignon

Château L., Pauillac
Teneurs pour 1 000 graines de raisin

Dates	Poids moyen 100 grains	Sucre g	Acidité totale	Alcalinité	Acide tartrique	Acide malique	Acide citrique
1952							
28/7	50	10	162	9,4	74	—	1,4
7/8	70	42	113	14,0	76	54	1,8
18/8	92	71	87	16,5	54	47	1,4
28/8	90	104	65	18,4	65	28	1,3
8/9	98	119	53	25,0	60	25	1,1
15/9	117	122	51	27,5	60	24	1,2
22/9	114	133	64	29,5	65	24	1,1
29/9	105	129	69	29,5	66	27	1,0
1953							
4/8	62	18	179	14,3	54	133	2,7
13/8	72	22	120	20,0	59	78	2,0
24/8	81	62	94	21,5	51	58	2,5
3/9	90	101	78	31,2	72	38	1,7
14/9	90	112	66	34,8	65	36	2,1
21/9	88	115	59	35,0	68	28	1,8
28/9	88	117	57	32,8	62	28	1,9
5/10	84	107	52	27,0	56	25	1,3
1954							
23/8	66	25	168	15,6	98	89	2,1
2/9	76	62	136	21,5	81	69	2,2
13/9	76	86	108	27,0	84	50	1,6
22/9	104	104	94	23,0	71	44	1,7
30/9	101	116	84	27,0	81	36	1,5
7/10	105	118	77	24,0	77	22	1,6
14/10	103	120	65	28,0	74	18	1,7

II. — GROSSEUR DE LA BAIE DE RASIN

A la demi-véraison. — La moyenne générale du poids de 100 baies, calculée pour les trois années et pour les cinq crus, est de 84 g pour le Merlot et de 63 g pour le Cabernet-Sauvignon. Mais ces poids sont susceptibles de variations très importantes : pour le Merlot de 65 à 108 g et pour le Cabernet-Sauvignon de 48 à 80 g, soit environ de 25 p. 100 en plus ou en moins. Dans un même cru et d'une année à l'autre, ils peuvent encore varier considérablement, par exemple de 67 à 108 g. La grosseur des raisins dépend beaucoup de l'année, ainsi qu'il ressort des moyennes suivantes :

	Merlot	Cabernet-Sauvignon
1952	73	56
1953	91	64
1954	88	69

En 1952, les raisins étaient donc plus petits à l'époque de la demi-véraison, tandis que pour les deux autres années ils sont assez semblables. Il est facile de mettre ces différences en parallèle avec la pluviosité de la période de formation du fruit (voir tableau II). En 1952, de la floraison à la demi-véraison, on compte deux fois moins de jours pluvieux et de hauteur de pluie qu'en 1953 et 1954, et le raisin par suite de cette sécheresse s'est beaucoup moins développé.

L'exposition ne semble pas jouer un rôle aussi important que l'année sur la grosseur du fruit. Nous n'observons pas de cru où les raisins soient systématiquement plus gros : le château F possède le plus gros Merlot et le plus petit Cabernet-Sauvignon, et les différences sont faibles.

En définitive, on note une très grande variabilité du poids de la baie, en relation avec les caractéristiques de l'année météorologique. D'autre part, on remarque que le raisin ne change pas de couleur simplement lorsqu'il atteint une certaine grosseur.

Au moment de la maturité. — Le poids moyen de 100 baies atteint à la maturité 126 g pour le Merlot et 95 g pour le Cabernet-Sauvignon. On note donc une augmentation de la grosseur du grain depuis la demi-véraison d'exactement 50 p. 100. Suivant l'année et le vignoble, les variations constatées, qui se répercutent évidemment sur les rendements en jus, sont de très grande amplitude : 106 g à 153 g pour le Merlot, 78 à 116 g pour le Cabernet-Sauvignon.

Cependant d'une année à l'autre la grosseur du grain est assez constante et les écarts observés à la véraison à ce sujet se sont atténués. Il faut mettre à part le comportement du Cabernet-Sauvignon en 1953, dont les grains sont restés plus petits. La chaleur de l'été 1953 a été peu propice au développement des fruits de ce cépage.

Si on calcule les moyennes par cru, on constate que la grosseur des grains varie autant ou même davantage d'un vignoble à un autre que suivant les conditions de l'année. L'influence de la nature du sol, des façons culturales et surtout les caractéristiques des populations clonales, qui n'étaient pas apparentes à la véraison, se font jour au moment de la maturité.

	Merlot	Cabernet-Sauvignon
1952	121	98
1953	129	85
1954	128	104

Evolution de la grosseur du raisin. — Elle augmente de façon régulière et continue. Elle a atteint son maximum dans nos observations presque toujours 8 jours avant les vendanges. D'une manière générale on note dans la dernière semaine une légère perte du poids moyen de la baie qui, dans certains cas, peut aller jusqu'à 10 p. 100. Cette diminution correspond à une légère concentration du grain par perte d'eau. On attend pour vendanger en Gironde que le raisin présente un peu de surmaturation ; cette augmentation de qualité s'obtient au détriment de la quantité.

III. — TENEURS EN SUCRE

A la demi-véraison. — Elle intervient au moment où le raisin présente une moyenne de 77 g de sucre par litre de jus (74 g pour le cépage Merlot, 80 g pour le Cabernet). Mais cette teneur est en réalité très variable : de 33 à 110 g pour le Merlot, de 36 à 100 g pour le Cabernet-Sauvignon. Elle dépend surtout de l'année. Voici les chiffres moyens calculés pour les cinq crus :

	Merlot		Cabernet-Sauvignon	
	par litre	p. 1 000 grains	par litre	p. 1 000 grains
1952	90	37	87	26
1953	45	26	64	27
1954	88	50	91	38

La teneur d'un litre de jus de raisin est pratiquement la même en 1952 et en 1954, elle est nettement inférieure en 1953. Cette année-là le raisin a véré avec beaucoup moins de sucre. A cause de la petitesse de la baie en 1952, la teneur en sucre dans le grain est à peine plus élevée en 1952 qu'en 1953 ; elle est très forte en 1954. Il est difficile de rattacher ces variations annuelles aux conditions atmosphériques ; les sommes des températures moyennes (voir tableau II) de la floraison à la véraison ne permettent pas d'expliquer ces différences. La moyenne journalière a bien été plus faible en 1953 qu'en 1952, mais elle a été encore plus faible

en 1954 et cependant cette dernière année présente la teneur en sucre la plus élevée. Ici entrent vraisemblablement en jeu les réserves de la plante, plutôt que la photosynthèse immédiate. MOREAU et VINET (3) ont démontré qu'au moment de la véraison étaient mobilisées les réserves glucidiques du bois de la vigne, ce qui explique l'enrichissement brusque du fruit en sucre. Mais nous ne connaissons pas les conditions qui président à la constitution de ces réserves, ni celles qui déterminent leur mobilisation.

Comme pour bien d'autres constituants du raisin, l'influence des conditions de l'année sur la teneur en sucre est plus forte que celle du cru, et les différences d'un vignoble à un autre sont faibles.

On peut encore conclure de ces observations que le raisin ne vère pas simplement lorsqu'il a atteint une certaine richesse en sucre. Il existe une totale indépendance entre la couleur de la pellicule, c'est-à-dire l'apparition des anthocyannes et la teneur en sucre.

Au moment de la maturité. — La richesse saccharine du moût de Merlot dépasse toujours de quelques grammes celle du Cabernet-Sauvignon. Pour les deux cépages c'est en 1954 que les taux de sucres furent les plus élevés dans les raisins mûrs, et en 1953 qu'ils furent les plus bas, comme ils l'étaient déjà à la demi-véraison. Ici encore, le caractère de l'année était acquis au moment de la véraison. Voici les chiffres moyens calculés pour les cinq vignobles, indiquant la teneur en sucres réducteurs par litre :

	Merlot	Cabernet-Sauvignon
1952	212	207
1953	204	199
1954	216	208

Or, c'est en 1954 que la période de la véraison à la maturité fut la plus froide, et en 1953 qu'elle fut la plus chaude (voir tableau III). Contrairement à toute attente, les teneurs en sucre se classent dans l'ordre inverse des sommes des températures. Il n'y a donc pas forcément de relation de cause à effet entre la richesse en sucre du moût et l'intensité de la photosynthèse durant la maturation, comme on le pensait jusqu'à maintenant. En tout cas les observations rapportées ici, même si on les limite à ces cas particuliers, infirment la généralité de cette relation.

Cependant on peut objecter que si on considère l'ensemble de la production girondine, le degré moyen des vins de 1954 est certainement plus faible que celui de 1953. Deux explications peuvent peut-être rendre compte de ces divergences.

Dans les cas étudiés ici, on a attendu le plus possible pour vendanger et on a ainsi permis la réalisation de l'optimum de maturité, ce qui n'a pas été partout le cas. On a eu ainsi la chance de bénéficier d'un temps très favorable aux vendanges. En effet, après un début d'octobre beau

mais frais, trois journées de pluie, les 8, 9 et 10, ayant provoqué un développement général de pourriture, peuvent être considérées comme le tournant de la maturation. Les huit jours de beau temps et de température croissante qui suivirent, stoppèrent cette invasion et tandis que le poids des grains diminuait (voir tableau VII), provoquèrent une concentration des raisins et un enrichissement du moût en sucre.

Deuxième raison : les vignes étudiées ici appartiennent aux meilleures parcelles de crus classés et c'est un fait d'observation que les grands crus présentent une grande constance de composition d'une année à l'autre, grâce sans doute à leur exposition privilégiée, aux soins culturaux et aussi à la faible productivité de la vigne. Pour des rendements de récolte plus élevés, l'écart de qualité des millésimes est certainement beaucoup plus grand.

La richesse en sucre est une des caractéristiques du cru. On peut mettre sur le même plan à ce sujet les châteaux L., C. F. et F. ; mais le château P. C. possède toujours les moûts les moins sucrés, ainsi que le rapporte le tableau ci-après qui donne pour chaque cru les teneurs moyennes en sucre calculées pour les trois années.

	Merlot	Cabernet-Sauvignon
Château L.	228	198
Château P.	205	209
Château P. C.	195	193
Château C. F.	213	215
Château F.	212	212

Evolution de la teneur en sucre. — La courbe d'enrichissement du fruit en sucre, lorsqu'on la trace, a une allure différente de celle de l'accroissement du grain. La teneur en sucre augmente beaucoup et très rapidement pendant le mois qui suit la véraison. Le sucre s'accumule plus vite que le grain ne grossit. La migration du sucre devient par la suite très lente et souvent dans la quinzaine qui précède la vendange, le sucre moyen du raisin n'augmente plus. Cependant la teneur par litre de moût augmente encore sous l'effet de la légère concentration. On sait qu'a pu être établie une relation entre le poids maximum du grain et le taux maximum de sucre (4).

En réalité, il faut bien voir que les choses ne se passent pas exactement comme le montrent les chiffres moyens. La marche de la maturation n'est pas synchrone dans tous les raisins ; il y a toujours sur le même cep et dans la même grappe, même lorsque toutes les baies ont changé de couleur, des grains peu sucrés et des grains très sucrés. Les grains de raisin font le plein de sucre un à un. L'évolution des constituants n'est pas la même si on considère ce qui se passe dans 100 grains ou, si on pouvait le suivre, dans un seul grain.

IV. — TAUX D'ACIDITÉ DU RAISIN

A la demi-véraison. — Les acidités de titration moyennes pour un litre de moût, sont de 312 méq pour le Merlot et de 330 méq pour le Cabernet-Sauvignon. Mais elles varient pour le premier cépage de 264 à 365 méq et pour le second de 232 à 380 méq. Ici encore l'année est déterminante.

	Merlot		Cabernet-Sauvignon	
	par litre	p. 1 000 grains	par litre	p. 1 000 grains
1952	339	148	359	109
1953	293	159	305	122
1954	304	164	328	135

En 1952, les raisins étant petits, l'acidité du grain s'est trouvée la plus faible, tandis que l'acidité du moût était la plus forte. C'est en 1953 que le jus fut le moins acide ; le caractère de l'année 1953 était déjà acquis à la véraison. En 1954, l'acidité du grain était la plus importante.

Bien qu'à un titre moindre que l'année, la situation du cru intervient aussi sur le caractère acide. C'est en effet à Pauillac que l'acidité moyenne, calculée pour les deux cépages et les trois années, est maximum (340 méq) ; c'est à Margaux et dans le vignoble de Saint-Émilion sur sol argilo-calcaire qu'elle est au contraire minimum (305 méq).

En résumé, on note une grande variabilité des acidités titrables au moment de la demi-véraison et l'apparition de la couleur du raisin reste tout à fait indépendante de l'acidité.

Au moment de la maturité — A la vendange, les acidités moyennes des moûts sont de 4,32 g par litre en acide sulfurique (88 méq) pour le Merlot et 5,10 g (104 méq) pour le Cabernet-Sauvignon. Ces chiffres expriment bien le caractère de ces cépages ; le Merlot est connu pour la souplesse des vins qu'il donne, tandis que les vins de Cabernet-Sauvignon sont toujours plus fermes et plus acides.

Les conditions de l'année sont déterminantes pour fixer l'acidité du raisin, mais le cru est un facteur tout aussi important, ainsi qu'il ressort des chiffres suivants représentant les acidités moyennes des moûts :

	Merlot	Cabernet-Sauvignon
1952	80	104
1953	84	99
1954	102	109
Château L.	87	109
Château P.	83	102
Château P. C.	98	116
Château C. F.	92	97
Château F.	81	95

C'est en 1954 que l'acidité a été, de beaucoup, la plus élevée à la

maturité, les deux autres années ayant des comportements assez semblables. Si le Merlot est un peu plus acide en 1953 qu'en 1952, c'est l'inverse qui est observé pour le Cabernet-Sauvignon et les écarts ne sont que de quelques milliéquivalents.

D'autre part, c'est le château P. C. qui a les raisins les plus acides et le château F. les raisins les moins acides.

Quant au pH, il est conditionné par le taux des acides libres, mais aussi par le taux des acides salifiés et il dépend de la nature des acides, en particulier de la proportion d'acide tartrique. Voici les valeurs moyennes du pH pour les trois années :

	Merlot	Cabernet-Sauvignon
1952	3,49	3,37
1953	3,37	3,20
1954	3,21	3,17

Evolution du taux d'acidité. — La chute d'acidité dans la baie pendant et depuis la véraison est d'abord très rapide, puis elle se ralentit et la diminution est faible au cours des trois dernières semaines. On assiste même parfois à une légère remontée finale de l'acidité de quelques milliéquivalents pour 1 000 grains de raisin. Lorsqu'on envisage l'acidité du moût, cette légère acidification est souvent nettement amplifiée par la perte d'eau du raisin qui se fait à ce moment.

V. — TENEURS EN MATIÈRES MINÉRALES

A la demi-véraison — Leur évolution est assez bien représentée par celle de l'alcalinité des cendres, qui en constitue la fraction la plus importante. Le taux d'alcalinité des cendres rapporté au litre est très semblable pour les deux cépages ; ici encore l'année, avant toute autre condition, imprime sa particularité, ainsi que le montrent les taux moyens ci-dessous exprimés en milliéquivalents par litre :

	Merlot		Cabernet-Sauvignon	
	par litre	p. 1 000 grains	par litre	p. 1 000 grains
1952	33	13	36	12
1953	45	25	43	17
1954	39	22	38	20

C'est en 1953 que l'alcalinité des cendres a été la plus forte et en 1952 qu'elle fut la plus faible. La pluviosité n'explique pas absolument ces différences. 1952 a été l'année la plus sèche, mais en 1954 la période d'avant-véraison a été aussi pluvieuse, sinon davantage qu'en 1953, avec un apport moindre de matières minérales dans le fruit. La mobilisation des bases, en relation avec la circulation de l'eau dans la plante, doit faire intervenir l'humidité du sol, mais encore l'appel de sève dû à l'importance de l'évaporation. Un mois d'août 1953 chaud, succédant aux

mois de juin et juillet pluvieux, a réalisé le maximum d'accumulation des matières minérales.

Au moment de la maturité — Les deux cépages ont pratiquement le même taux d'alcalinité des cendres et les différences d'un cru à un autre sont négligeables. Comme à la demi-véraison, mais cependant avec moins d'amplitude, c'est l'année qui exerce l'influence la plus marquée sur l'accumulation des cations dans le raisin mûr. Le classement n'est plus le même qu'au moment de la véraison. Les années 1952 et 1953 ont conduit à des taux très voisins, tandis que 1954 a donné des valeurs d'alcalinité des cendres nettement plus faibles. Les teneurs moyennes sont indiquées ci-dessous en milliéquivalents par litre :

	Merlot	Cabernet-Sauvignon
1952	57	55
1953	58	55
1954	46	44

La considération des chiffres qui expriment simplement la pluviosité ne donne pas encore ici l'explication de ces différences. L'automne de 1954 a surtout été plus froid que les précédents et en conséquence la circulation de l'eau dans la plante a dû être ralentie.

Evolution du taux de matières minérales. — Comme tous les phénomènes de la maturation, l'apport des matières minérales n'est pas régulier. Il est rapide au début et pratiquement nul à la fin, sauf le cas exceptionnel du Merlot de 1952 à Pauillac pour lequel la migration minérale s'est poursuivie jusqu'à la maturité complète. L'augmentation de ces substances est proportionnellement plus importante que le développement du fruit.

Nous observons encore ici l'évolution habituelle de la teneur en ammoniaque : la protéosynthèse qui accompagne la maturation se traduit par une diminution continue de cette fraction de l'azote.

La teneur en acide phosphorique du moût paraît avoir un comportement beaucoup plus irrégulier ; elle peut du reste être influencée par la façon d'effectuer le pressurage des raisins.

VI. — TENEURS EN ACIDE TARTRIQUE

A la demi-véraison — Ce sont encore les conditions de l'année, beaucoup plus que le cru, qui règlent la teneur en acide tartrique :

	Merlot		Cabernet-Sauvignon	
	par litre	p. 1 000 grains	par litre	p. 1 000 grains
1952	211	82	211	64
1953	155	82	149	60
1954	197	110	200	84

Les écarts atteignent 40 p. 100 d'une année à l'autre. C'est en 1953 que les teneurs par litre furent les plus faibles et en 1954 qu'elles furent les plus élevées dans le grain de raisin. Les raisins en 1952 étant plus petits et moins juteux, ont donné un jus d'écrasement plus concentré en acide tartrique, pour cependant une richesse absolue de la baie ne dépassant pas le taux de 1953.

Par ailleurs, l'acide tartrique est à peu près indépendant du cépage et varie peu d'un cru à un autre (18 p. 100).

On peut noter que le pH du jus de raisin vert est assez bien en rapport avec le taux d'acide tartrique.

Au moment de la maturité. — Comme on l'a déjà observé à la demi-véraison, le taux d'acide tartrique des raisins dépend beaucoup plus de l'année que de la situation du cru. En effet, les différences entre les vignobles sont minimes, tandis que les écarts d'une année à l'autre sont importants surtout pour le Merlot, ainsi que le montrent les chiffres ci-dessous :

	Merlot		Cabernet-Sauvignon	
	par litre de moût	pour 1 000 grains	par litre de moût	pour 1 000 grains
1952	99	68	114	61
1953	106	86	111	57
1954	127	93	124	74

C'est en 1954 que le grain de raisin fut le plus riche en acide tartrique et cette particularité s'est conservée depuis la véraison. Les conditions météorologiques particulières de 1954, et sans qu'on puisse préciser si c'est la pluviosité ou l'absence de chaleur qui est en cause, ont abouti à un stockage plus important de cet acide dans le grain. Il est possible que la synthèse de cet acide dans la feuille ait été plus importante, ou que sa combustion ait été plus ménagée.

Le Cabernet-Sauvignon, avec une teneur moyenne de 117 méq d'acide tartrique, est un peu plus riche que le Merlot. Il doit donc son acidité plus élevée autant à un excès d'acide tartrique qu'à un excès d'acide malique.

Evolution du taux d'acide tartrique. — Les graphiques 4 et 5 comparent l'évolution des acides tartrique et malique dans le grain de raisin Merlot, dans deux vignobles, pour les trois années.

Par opposition à l'acide malique qui diminue constamment dans le grain de raisin, on a l'habitude de considérer le taux d'acide tartrique du grain comme assez constant. Ceci est exact dans les grandes lignes,

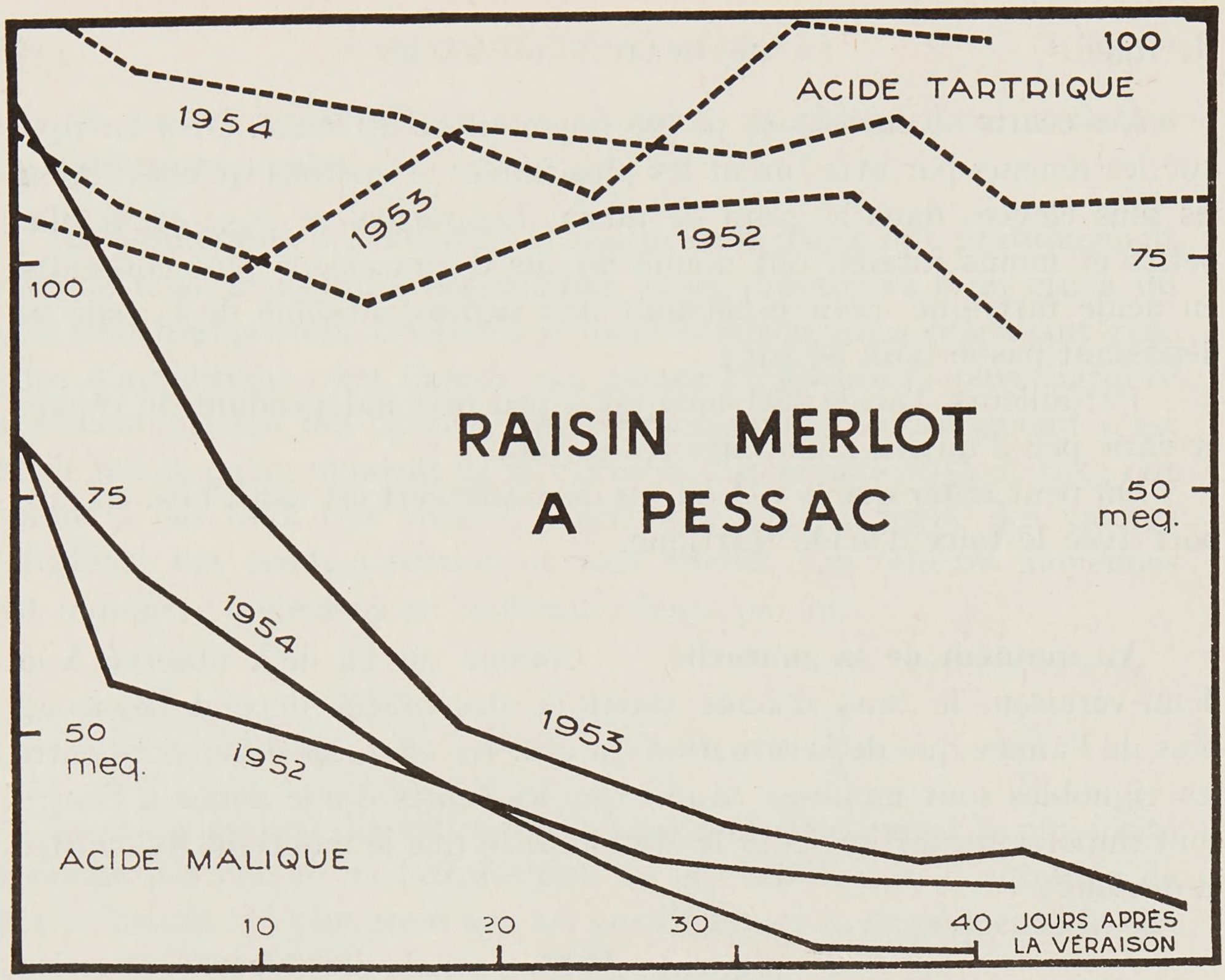

RAISIN MERLOT
A PESSAC
ACIDE TARTRIQUE
100
75
1954
1953
1952
100
75
50
meq.
ACIDE MALIQUE
1954
1953
1952
50
meq.
10
20
30
40
JOURS APRÈS
LA VÉRAISON

FIG. 4.

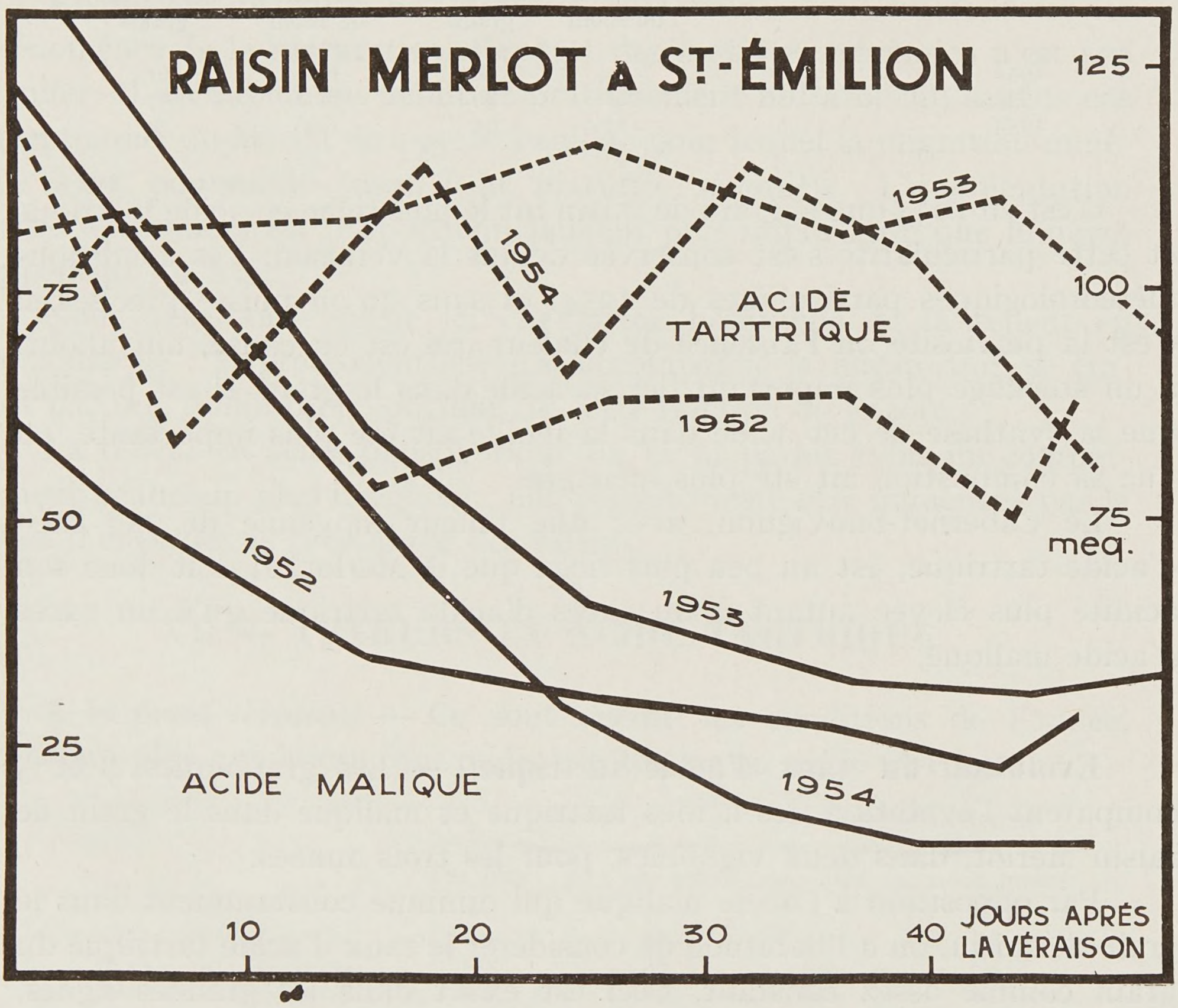

RAISIN MERLOT A ST-ÉMILION
125
75
1954
1953
ACIDE
TARTRIQUE
100
1952
50
75
meq.
1952
1953
1954
25
ACIDE MALIQUE
10
20
30
40
JOURS APRÈS
LA VÉRAISON

FIG. 5.

lorsqu'on n'envisage que les doses initiale et finale de la période de maturation. Ceci l'est beaucoup moins dans le détail et en réalité, pour chacune de ces trois années, le taux d'acide tartrique a subi des fluctuations continuelles qu'expriment parfaitement les graphiques. La migration et la combustion de cet acide sont des phénomènes discontinus. Il n'est pas impossible même que des prélèvements effectués à des intervalles plus rapprochés, journaliers par exemple, fassent ressortir des variations de plus grande amplitude.

On peut remarquer que le comportement de l'acide tartrique au cours de ces trois années est bien différent de ce qu'il fut en 1937, où il passa par un minimum très marqué coïncidant avec la période de sécheresse, et en 1938 où, grâce à une bonne répartition des précipitations atmosphériques, il présenta une bien meilleure constance.

VII. — TENEURS EN ACIDE MALIQUE

A la demi-véraison. — On note sur la teneur en acide malique l'interférence de trois facteurs, presque aussi importants : l'année, le cépage et le cru. Voici les moyennes des taux d'acide malique exprimés en milliéquivalents par litre de moût et pour 1 000 grains.

	Merlot		Cabernet-Sauvignon	
	par litre	p. 1 000 grains	par litre	p. 1 000 grains
	—	—	—	—
1952	159	60	190	55
1953	193	103	203	79
1954	150	81	169	69

Si on considère les teneurs par litre, c'est en 1953 que l'acide malique fut le plus abondant au départ de la maturation et en 1954 qu'il fut le plus faible. En 1954, année froide, le raisin s'annonçait déjà à la véraison comme riche en acide tartrique et contrairement à ce qu'on aurait pu penser, comme relativement pauvre en acide malique.

La situation du vignoble intervient encore sur le taux de cet acide : il est minimum à Saint-Émilion sur sol argilo-calcaire, avec 160 méq et maximum à Pessac avec 197 méq.

En définitive, à la demi-véraison, l'acide malique a varié de 28 p. 100 suivant l'année, de 23 p. 100 suivant le cru, de 20 p. 100 suivant le cépage.

Au moment de la maturité. — De même l'acide malique est un des rares constituants chimiques du raisin mûr qui doive ses variations autant au caractère du cru qu'au caractère de l'année ; d'autre part, la richesse en acide malique est spécifique du cépage. On retrouve à la

maturité les observations faites à la demi-véraison. Voici le tableau des teneurs moyennes par litre de moût calculées par année et par cru :

	Merlot	Cabernet-Sauvignon
1952	38	45
1953	32	42
1954	22	27
Château L.	21	42
Château P.	30	32
Château P. C.	39	49
Château C. F.	35	31
Château F.	28	36

Des trois années étudiées, 1954 se détache nettement par ses faibles teneurs en acide malique. Or ce fut l'année où la maturité fut la plus tardive et où l'été fut le plus froid. On a déjà vu qu'à la demi-véraison, le raisin fut en 1954 le plus pauvre en acide malique.

Ces résultats analytiques pouvant surprendre, nous avons tenu à les confirmer par une estimation chromatographique de l'acide malique selon le mode opératoire indiqué par Pascal RIBEREAU-GAYON (4). Cette technique permet, par l'observation de la grandeur et de l'intensité des spots sur le papier, sinon de donner des valeurs absolues, néanmoins de faire des comparaisons précises. On distingue ainsi que pour la plupart des moûts de 1954, l'acide malique est plus faible que les autres années, et que pour quelques autres, il est tout au plus égal, ce qui confirme pleinement les résultats du dosage chimique.

Il en résulte donc qu'effectivement en 1954 la vigne a synthétisé moins d'acide malique. Avec des conditions de combustion moins favorables, le taux final d'acide malique est cependant très inférieur à celui des autres années.

Par ailleurs, c'est à Pessac que l'acide malique est le plus abondant et à Margaux, qu'il est en moyenne le plus faible. Le Cabernet-Sauvignon est toujours plus riche en acide malique que le Merlot : en moyenne, 38 méq au lieu de 31.

Evolution du taux d'acide malique. — L'acide malique diminue de manière assez régulière, très rapidement au moment où vère le raisin, plus lentement ensuite. Cependant les courbes d'une année à l'autre ne sont pas toujours absolument parallèles. Le graphique 4 montre qu'en 1952 la diminution a été moins rapide et qu'en 1954, elle fut plus importante que ne l'auraient laissé prévoir les conditions météorologiques.

On note parfois une légère remontée de la teneur en acide malique dans les jours qui précèdent la maturité. La migration n'est donc nulle à aucun moment de la maturation.

Par ailleurs, la teneur des moûts en acide citrique, toujours très faible, diminue nettement pendant la maturation ; considérée dans le grain de raisin, elle reste stable ou, dans certains cas, subit une diminution progressive.

VIII. — CONCLUSIONS

Un certain nombre de conclusions peuvent être tirées de ces résultats :

1. Les taux des différents constituants du raisin à la demi-véraison dépendent de facteurs différents, et ils sont indépendants les uns des autres. La véraison est basée notamment sur le changement d'apparence du raisin, c'est-à-dire pour le raisin rouge sur l'apparition des anthocyannes dans la pellicule. Or ce phénomène est indépendant de la grosseur du fruit, de sa richesse en sucre, ou en acidité, ou en matières minérales, ou en acide tartrique ou malique. Il en résulte, lorsque la coloration du fruit se fait tardivement, ce qui fut le cas en 1954 par exemple, que le raisin est déjà très sucré à la véraison.

Les phénomènes de synthèse, de migration ou de combustion qui règlent la composition du raisin ne suivent pas des marches parallèles pour les divers constituants.

2. Le rapport acide tartrique/acide malique à la demi-véraison est très variable : il va de 0,54 à 1,80. Suivant les conditions, la vigne synthétise de préférence de l'acide tartrique ou de l'acide malique. A la demi-véraison, il y eut en 1952 autant de l'un que de l'autre ; en 1953, toujours beaucoup moins d'acide tartrique que d'acide malique et en 1954, au contraire, presque toujours plus d'acide tartrique que d'acide malique.

3. Lorsqu'on considère des vignobles de qualité, donnant des rendements très faibles, on observe d'une année à l'autre une très bonne constance des taux de sucre au moment de la maturité du raisin. Par contre les acidités varient beaucoup. Pour une certaine catégorie de grands vins, les millésimes sont différenciés beaucoup plus par l'acidité des vins que par leur richesse alcoolique. Ainsi l'année 1954, malgré des conditions défavorables tout au long de la formation du fruit et de sa maturation, a permis d'atteindre dans les crus étudiés un degré assez peu différent de celui des années passées ; mais l'acidité de titration du Merlot par exemple a été de 28 p. 100 plus élevée qu'en 1952.

4. L'alcalinité des cendres n'est pas une constante et l'accumulation des matières minerales est plus faible certaines années. Elle n'est pas en rapport direct avec la pluviosité, mais lorsque l'humidité du sol est suffisante, elle est en relation avec la température, qui conditionne l'évaporation et la circulation de la sève dans la plante.

5. Le taux d'acide tartrique est également variable et les millésimes se différencient à la fois par les teneurs du raisin en acide tartrique et en acide malique. C'est en 1954, qu'il y eut le plus d'acide tartrique et le moins d'acide malique dans le raisin mûr.

Par ailleurs, on ne note aucun parallélisme entre la migration de l'acide tartrique et celle des matières minérales.

6. Finalement, par ses conditions météorologiques, l'année influe

sur tous les constituants chimiques du raisin, mais tout particulièrement sur la constitution de l'acidité et sur les matières minérales.

7. La richesse en sucre est une des caractéristiques du cru, ainsi que l'acidité de titration, mais surtout l'acide malique. Par contre l'alcalinité des cendres et l'acide tartrique pour une année donnée, sont très constants d'un cru à un autre.

8. Le Merlot est un peu plus sucré et nettement moins acide, aussi bien en acide tartrique qu'en acide malique, que le Cabernet-Sauvignon. Par contre les deux cépages ont les mêmes alcalinités des cendres. Par ailleurs, le Merlot est plus sensible aux conditions extérieures que le Cabernet-Sauvignon et le taux de ses constituants chimiques est beaucoup plus variable d'une année à l'autre.

9. Le développement du grain est progressif durant le cours de la maturation, mais dans nos observations il a atteint son maximum une semaine avant les vendanges. On enregistre ensuite une légère perte de poids correspondant à une surmaturation.

10. Le sucre augmente beaucoup et très rapidement dans le raisin pendant le mois qui suit la véraison. Le sucre est stocké plus vite que le grain ne grossit. Par la suite la migration sucrée se ralentit, et souvent dans la quinzaine qui précède la cueillette, le sucre moyen du raisin n'augmente plus.

11. C'est d'ailleurs la physionomie habituelle des divers phénomènes de la maturation : l'accumulation des matières minérales est rapide au début et nulle à la fin ; de même la diminution des acides, et tout particulièrement de l'acide malique, est surtout importante lorsque le raisin vère. On observe même souvent une légère remontée de l'acidité dans les derniers jours. En somme, la maturation apparaît comme un phénomène brusque dès la véraison et uniformément ralenti jusqu'à l'état final de la maturité.

12. L'évolution irrégulière de l'acide tartrique montre que la migration et la combustion de cet acide sont des phénomènes discontinus.

13. Précisément la conclusion la plus importante de ces analyses concerne, à notre avis, les évolutions des acides tartrique et malique, et les taux qu'ils présentent à la maturité, suivant les conditions météorologiques de l'année.

Il se dégageait de nos premiers documents publiés (1) et de la théorie de la combustion respiratoire des acides (6) que le taux d'acide malique du raisin mûr devait être en rapport étroit avec la température de l'été. L'acidité plus ou moins élevée et la qualité des vins des divers millésimes s'expliquaient de cette façon.

Il apparaît aujourd'hui que, tout en demeurant valable certaines années, cette théorie ne fait pas assez de place aux phénomènes de synthèse et de migration et au rôle de l'acide tartrique. Certaines années, et

ce ne sont pas les plus chaudes, la vigne synthétise davantage d'acide tartrique et moins d'acide malique et le raisin doit alors son acidité élevée davantage à son taux d'acide tartrique qu'à celui d'acide malique. Ce fut le cas par exemple en 1954. Il faut bien voir que l'acide tartrique du raisin contribue au même titre que l'acide malique à fixer l'acidité finale du raisin.

Reçu pour publication le 10 mai 1955

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) PEYNAUD (E.). — Maturation des cépages fins du Bordelais en 1937. *Soc. Sciences Phys. Nat. Bordeaux*, 5 et 19 mai 1938.

PEYNAUD (E.). — Sur les variations de l'azote du raisin au cours de la maturation. *Rev. de Vitie.*, 1939, **90,** 189 et 213.

PEYNAUD (E.). — Maturation des raisins dans le Bordelais en 1938. *Soc. Sciences Phys. Nat. Bordeaux*, 30 mars 1939.

PEYNAUD (E.). — Contribution à l'étude biochimique de la maturation du raisin et de la composition des vins. *Thèse Ingénieur-Docteur*, Bordeaux, 1946.

PEYNAUD (E.) et MAURIE (A.). — Sur l'évolution de l'azote dans les différentes parties du raisin au cours de la maturation. *Ann. de Technologie agric.*, 1953, **2**, 15.

PEYNAUD (E.) et MAURIE (A.). — Évolution des acides organiques dans le grain de raisin au cours de la maturation en 1951. *Ann. de Technologie agric.*, 1953, **2**, 83.

(2) CHARPENTIE (Y.). — Contribution à l'étude biochimique des facteurs de l'acidité des vins. *Ann. Technologie agric.*, 1954, **3**, 89.

(3) MOREAU (L.) et VINET (E.). — Rôle des matières de réserve de la vigne dans la mise à fruit des cépages et dans la véraison des raisins. *Ann. Agronomiques*, 1932, p. 363-374.

(4) POUX (C.). — Relation entre le poids des sucres et le poids de matière fraîche dans les raisins de différentes variétés de *Vitis vinifera* au moment de la maturité. *C. R. Acad., Agric.*, 1950, **36**, 605.

(5) RIBEREAU-GAYON (Pascal). — Évaluation de l'acide malique des vins par chromatographie sur papier. *Ann. Falsif. Fraudes*, 1954, **47**, 3-8.

(6) GENEVOIS (L.). — Formation et évolution biologique des acides organiques dans les raisins. *Rev. de Vit.*, 1938, **88**, 103.

DOCUMENTATION

DONNÉES ACTUELLES SUR LES PROCESSUS DE L'OXYDATION DE L'ACIDE TARTRIQUE ET SUR LA SÉPARATION CHROMATOGRAPHIQUE DES ACIDES ORGANIQUES DU VIN

PAR

Léonce DEIBNER

Station Centrale de recherches sur l'œnologie, la Cidrerie et les jus de fruits, Narbonne.

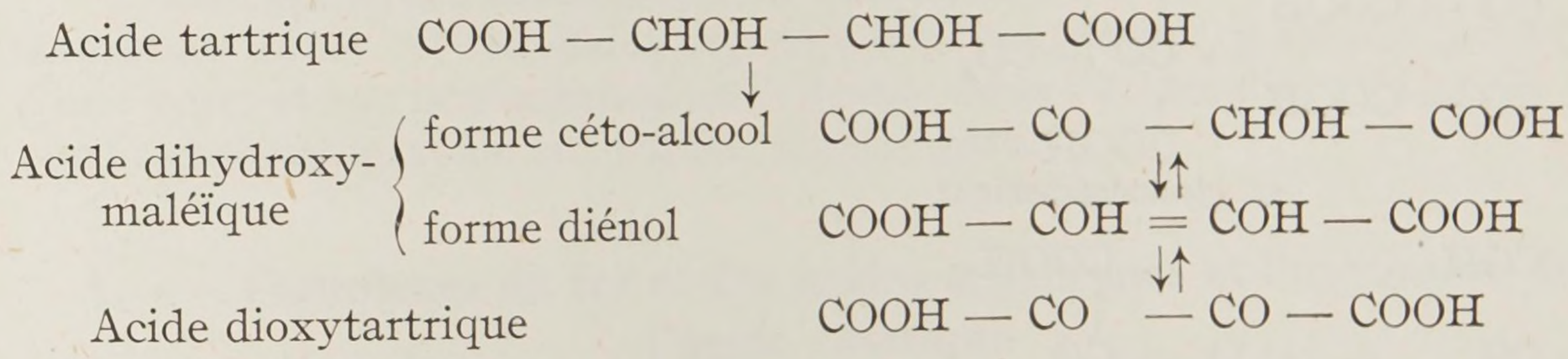
I. — INTRODUCTION

On sait que le vin absorbe lentement l'oxygène de l'air. La quantité d'oxygène ainsi absorbé pendant 24 h oscille entre 0,25 à 1,5 ml par litre et dépend des teneurs des substances tanniques, des colorants, des aldéhydes, de l'anhydride sulfureux et des acides organiques.

Par l'élimination des substances colorantes et tanniques ainsi que de l'acide tartrique à l'aide de l'acétate de plomb, cette propriété du vin disparaît complètement, tandis que l'élimination des tanins et des colorants au moyens de la poudre de peau détermine sa dimunition de 60-70 p. 100.

On peut dire sans crainte que les processus d'oxydation dans les vins s'effectuent aux dépens des tanins, des colorants et des dioxyacides en présence des sels des métaux lourds. Dans ces conditions l'oxydation des oxyacides en présence des sels de fer constitue une réaction très importante. Pour Genevois (1) « l'étude du vieillissement du vin doit commencer par l'étude du vieillissement des solutions tartriques ».

L'oxydation de l'acide tartrique peut être illustrée, en première approximation, par le schéma suivant :



Il existe un certain nombre de points discordants en ce qui concerne les conditions des réactions d'oxydation de l'acide tartrique et de ses dérivés. Il est donc intéressant de considérer les propriétés de ces corps en lumière des conclusions des récents travaux. Le but de ce mémoire consiste dans la confrontation de ces conclusions avec les conceptions basées sur les études effectuées avant 1940.

II. — APERÇU DES TRAVAUX ANTÉRIEURS

Les propriétés des dérivés de l'oxydation de l'acide tartrique avaient été étudiées dans le passé par différents chercheurs.

Une grande sensibilité de l'acide tartrique aux agents oxydants est fort connue. FENTON (2) a été le premier à étudier le processus de son oxydation en acide dihydroxymaléique sous l'effet catalytique des sels ferreux.

NEUBERG et SCHWENK (3) ont préparé l'acide dihydroxymaléique par l'action du peroxyde d'hydrogène en présence de sulfate ferreux sur l'acide tartrique.

SCHMALFUS et BARTHMEYER (4) ont mis au point les réactions qualitatives pour les acides dihydroxymaléique et dicétosuccénique (dioxytartrique) à l'aide de tétrachlorure de titane.

WIELAND et FRANKE (5) constatent aussi que les ions ferriques sont inactifs ; ils sont faiblement actifs en présence de peroxyde d'hydrogène. Par contre, l'oxydation de l'acide dihydroxymaléique par l'oxygène s'effectue en présence des ions ferriques. Pour ces auteurs, les ions ferreux s'unissent avec le corps à oxyder ce qui détermine l'oxydabilité plus prononcée de ce dernier.

MANCHOT (6), WARBURG (7), GOARD, RÉDÉAL (8) expliquent l'activité des sels ferreux par la formation de peroxyde FeO_2.

BAUDISH et WELO (9) admettent la formation d'un complexe de ce peroxyde avec le corps oxydable.

SMYTHE (10) a également étudié les oxydations en présence du fer ; entre autres il a constaté que la formation du tartrate ferreux dépend du pH.

D'après FRANKE (11) le fer ferrique forme avec l'acide tartrique un sel complexe, comme, d'ailleurs, le fer ferreux.

En lumière de toutes ces constatations le processus de l'oxydation de l'acide tartrique peut être présenté comme suit :

$$\begin{array}{l}\mathrm{CHOH-COOH}\\ |\\ \mathrm{CHOH-COOH}\end{array} + \mathrm{Fe^{++}} + 1/2\ \mathrm{O_2} \rightarrow \begin{array}{l}\mathrm{COH-COOH}\\ \|\\ \mathrm{COH-COOH}\end{array} + \mathrm{H_2O} + \mathrm{Fe^{+++}}$$

ac. tartrique — ac. dihydroxymaléique

$$\begin{array}{l}\mathrm{COH-COOH}\\ \|\\ \mathrm{COH-COOH}\end{array} + 1/2\ \mathrm{O_2} \rightarrow \begin{array}{l}\mathrm{CO-COOH}\\ |\\ \mathrm{CO-COOH}\end{array} + \mathrm{H_2O}$$

ac. dicétosuccinique

$$\begin{array}{l}\mathrm{CO-COOH}\\ |\\ \mathrm{CO-COOH}\end{array} \rightarrow \begin{array}{l}\mathrm{COH}\\ |\\ \mathrm{CO} + \mathrm{CO_2}\\ |\\ \mathrm{COOH}\end{array}$$

ac. glyoxalcarbonique

$$\begin{array}{l}\mathrm{COH}\\ |\\ \mathrm{CO}\\ |\\ \mathrm{COOH}\end{array} + 1/2\ \mathrm{O_2} \rightarrow \begin{array}{l}\mathrm{COOH}\\ |\\ \mathrm{CO}\\ |\\ \mathrm{COOH}\end{array}$$

ac. mesoxalique

Finalement ces réactions s'arrêtent en raison de l'accumulation du fer ferrique. Disons quelques mots au sujet des noms des acides dicétosuccinique et dihydroxymaléique. En effet, il existe l'habitude de donner à l'acide dicéto-

succinique (acide butanedione-dioïque) le nom d'acide dioxytartrique ; or, la formule chimique de ce dernier est la suivante :
COOH - C $(OH)_2$ - C $(OH)_2$ - COOH (acide butanetétrol-dioïque ou tétraoxy-succinique.)

Quant à l'acide dihydroxymaléique, il apparaît, d'après les résultats des recherches de CUPTA (12) et de HARTREE (13), que sa constitution correspond à l'acide dihydroxyfumarique.

Les propriétés de l'acide dihydroxymaléique ont été étudiées également par GENEVOIS et GAY (14). Ces chercheurs ont trouvé qu'une solution de tartrate ferreux, le tartrate étant en excès, à pH 3-7 s'oxyde sous l'action de traces d'oxygène pour donner de l'acide diohydroxymaléique ; il se produit des traces de sels ferriques.

GATET et GENEVOIS (15) ont continué l'étude des propriétés de l'acide dihydroxymaléique en montrant sa transformation en acides dicétosuccinique, glyoxylcarbonique et en aldéhyde glyoxylique. Finalement ces auteurs concluent que le processus de formation de l'acide dihydroxymaléique s'explique par l'oxydation de l'acide tartrique par les sels ferriques. Ce rôle des sels ferriques est de nouveau souligné dans les différentes publications [*op. cit.* (1)] (16). BARAUD (17-*a*) précise, toutefois, que l'acide dihydroxymaléique dérivé de l'acide tartrique par oxydation sous l'effet catalytique des sels ferreux. Ce chercheur a utilisé pour le dosage de l'acide dicétosuccinique la réaction de ZIEGLER et LOCHER (18) basée sur sa combinaison avec le parasulfophénylhydrazine ; la formation d'un colorant jaune, la « tartrazine » a été étudiée par FENTON [*op. cit.* (2)], par GAY [*op. cit.* (14) p. 73], par GENEVOIS et GATET [*op. cit.* (15)]. Cette réaction, appliquée aux vins, permet l'évaluation de l'acide ascorbique, de l'acide dioxytartrique et de la réductone.

Les conceptions de GENEVOIS et de RIBÉREAU-GAYON sur la formation de l'acide dihydroxymaléique à partir de l'acide tartrique sous l'effet des ions ferriques sont contraires aux conclusions de leurs prédécesseurs, ce qui a provoqué la réplique de RODOUPOLO qui a publié en 1951 un important mémoire sur l'oxydation de l'acide tartrique en présence du fer (19), suivi d'autres publications.

Nous avons signalé brièvement ces travaux dans quelques articles parus en 1954 (20).

III. — SIGNIFICATION THÉORIQUE ET PRATIQUE DES RÉSULTATS DE RÉCENTS TRAVAUX

Nous exposerons successivement les résultats de travaux récents sur les complexes du fer et des acides organiques et l'oxydation de l'acide tartrique, d'une part, et sur la séparation et le dosage de ces acides du moût et du vin par la chromatographie sur papier, d'autre part.

A. — Complexes du fer et des acides organiques et l'oxydation de l'acide tartrique

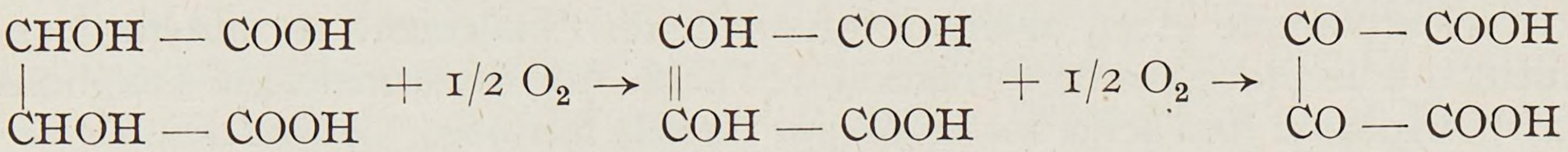
a) Processus de l'oxydation de l'acide tartrique

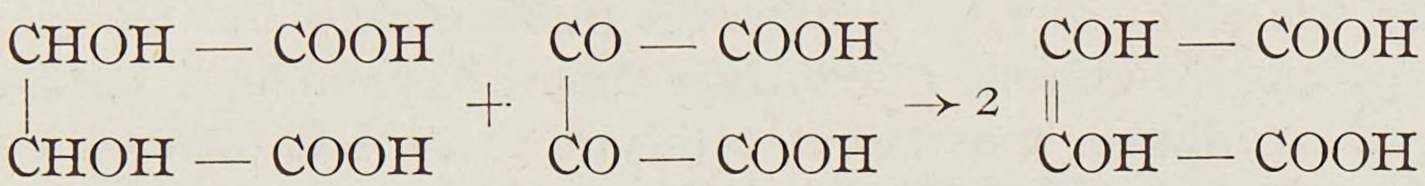
RODOPOULO [*op. cit.* (19)] a étudié l'oxydation de l'acide tartrique et de l'acide dihydroxymaléique dans les solutions simples, dans le jus de raisin et dans les vins à l'aide de l'appareil de WARBURG. Il ressort de ses nombreux

essais que les ions ferriques ne sont pas capables d'oxyder l'acide tartrique ; par contre, en leur présence, l'oxydation de l'acide dihydroxymaléique est plus rapide ce qui s'explique par la réduction de ces ions en ions ferreux, possédant une activité catalytique. On sait que l'acide dihydroxymaléique est un corps très oxydable et que son oxydation est énergique à partir de + 20°-+ 25°C.

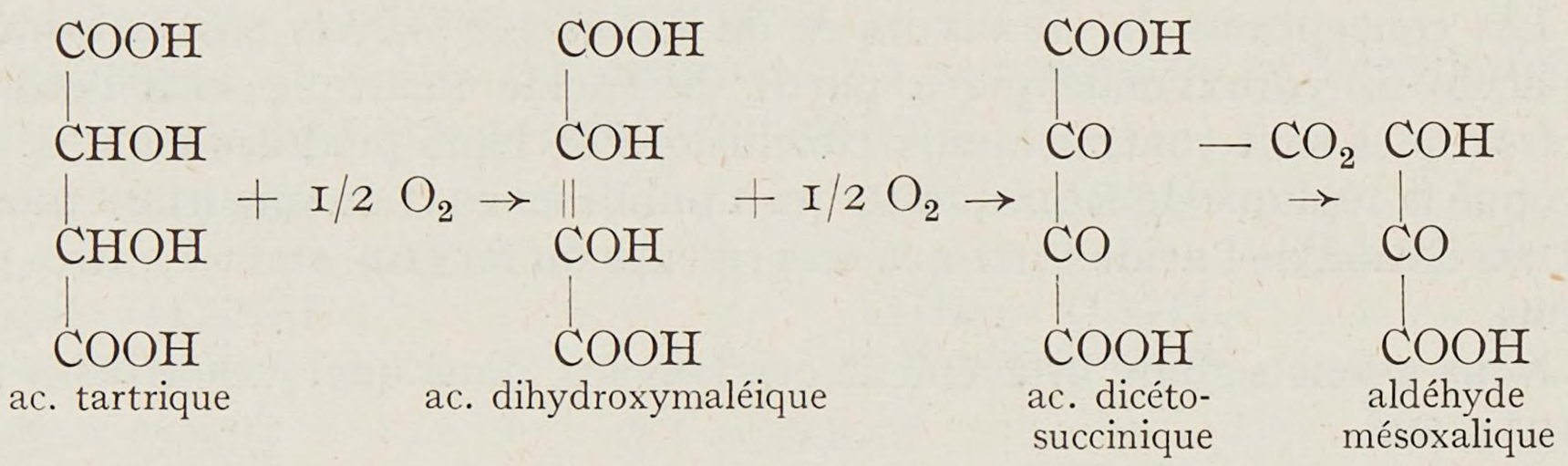
En présence du fer ferreux, activeur de l'oxygène de l'air, l'acide tartrique s'oxyde facilement sans que l'on constate la proportionnalité entre la concentration du catalyseur et la quantité d'oxygène absorbé. La réaction devient de moins en moins intense en raison de la formation du fer ferrique.

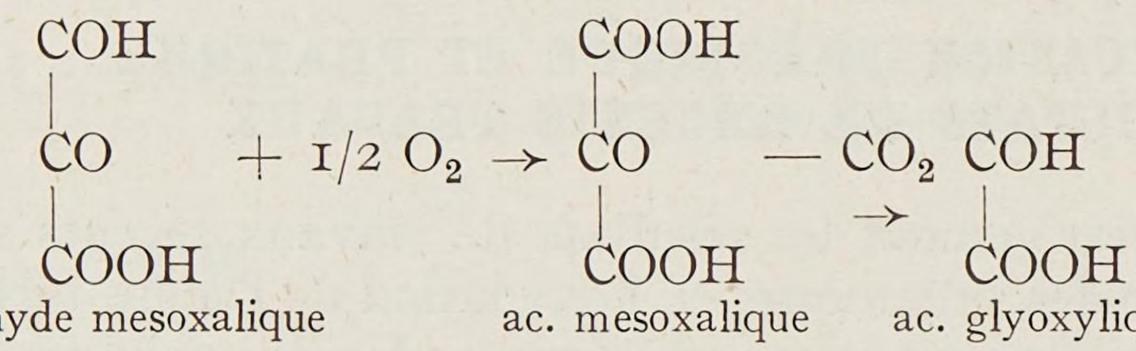
Par addition d'acide dihydroxymaléique au mélange d'acide tartrique et du sulfate ferreux la vitesse d'absorption de l'oxygène, ainsi que sa quantité absorbée, augmente de 3 fois. Dans ce cas l'oxydation de l'acide dihydroxymaléique est rapide car l'acide dicétosuccinique réagit à son tour sur l'acide tartrique suivant les équations





L'existence du processus de décarboxylation, à côté de celui de l'oxydation, a amené Rodopoulo a effectuer, à l'aide de l'appareil de Warburg, les bilans de l'oxygène absorbé et de l'anhydride carbonique dégagé. Il ressort de ces études que l'oxydation de l'acide tartrique doit s'effectuer d'après le schéma suivant :



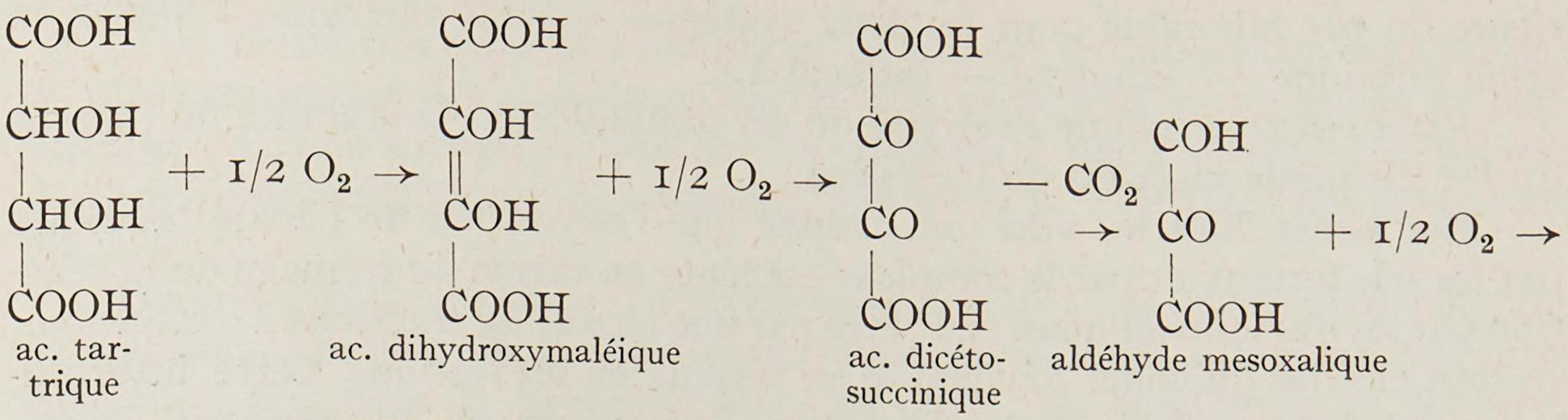


Lors de ces essais l'acide glyoxylique a été identifié à l'aide du procédé de Fosse et Hieule (21) ; il existe également le procédé sensible de Kolesnikov (22) ; quant aux acides dihydroxymaléique et dicétosuccinique, ils étaient décelés à l'aide de la réaction de Schmalfus et Barthmeyer en employant le tétrachlorure de titane [*op. cit.* (4)].

Les expériences ont démontré que l'acide glyoxylique s'oxyde en donnant naissance à l'acide oxalique.

Rodopoulo a étudié également l'oxydation de l'acide tartrique dans le jus de raisin et dans le vin. Il a été établi que le processus d'oxydation de cet acide dans le jus s'effectue suivant le schéma indiqué précédemment. Lors de ces essais sur le vin, les acides dihydroxymaléique, dicétosuccinique, glyoxy-

lique, oxalique et le glyoxal ont été identifiés. Les transformations de ces acides dans le vin comportent une série de réactions que voici :



L'acide tartrique des vins s'oxyde facilement, en présence du fer ferreux, en acide dihydroxymaléique qui, à son tour, en présence de l'air, s'oxyde en acide dicétosuccinique. Si à ce stade on arrête l'accès de l'oxygène, l'acide dicétosuccinique agira sur l'acide tartrique avec production d'acide dihydroxymaléique. Les vins, conservés à l'abri de l'air, possèdent un bouquet et un goût agréables, dus à la présence de l'acide dihydroxymaléique ; corrélativement à cette amélioration le potentiel d'oxydo-réduction diminue fortement.

Si ce même vin est aéré, l'acide dicétosuccinique formé se décarboxyle, s'oxyde jusqu'à l'acide glyoxylique ; ce dernier finalement donne naissance à l'acide oxalique. On sait que les vins suffisamment aérés possèdent un goût dur dû à la présence de l'acide oxalique. Les dosages effectués ont montré que dans un vin aéré la teneur en acide oxalique est de 20 p. 100 en plus par rapport au jus de raisin initial.

b) Rôle des complexes organiques du fer et des acides organiques

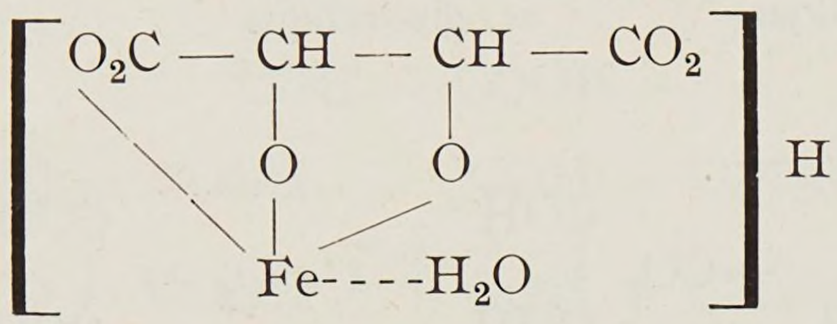
Comme on le sait, WIELAND et FRANKE [*op. cit.* (5)] expliquent l'activité oxydative du fer ferreux en présence d'une substance oxydable par la formation d'un complexe de cet élément.

RODOPOULO a apporté une confirmation expérimentale de ce point de vue Il a isolé le sel complexe du fer et de l'acide tartrique et a étudié son action catalytique sur les solutions simples de l'acide tartrique ainsi que dans le vin, à l'aide de l'appareil de WARBURG. Le sel isolé est de couleur jaune canari. Son activité catalytique est supérieure à celle du fer ferreux de 5 fois. En présence du sulfate ferreux l'oxydation de l'acide tartrique est intensive pendant les premières 60 minutes, ensuite elle s'affaiblit et s'arrête. Quant au complexe tartrique du fer, sa période d'induction est plus longue ; le maximum d'oxydation est atteint au bout de 60 minutes et continue pendant longtemps. La préparation de ce complexe doit se faire à l'abri de l'air. En effet, la présence de

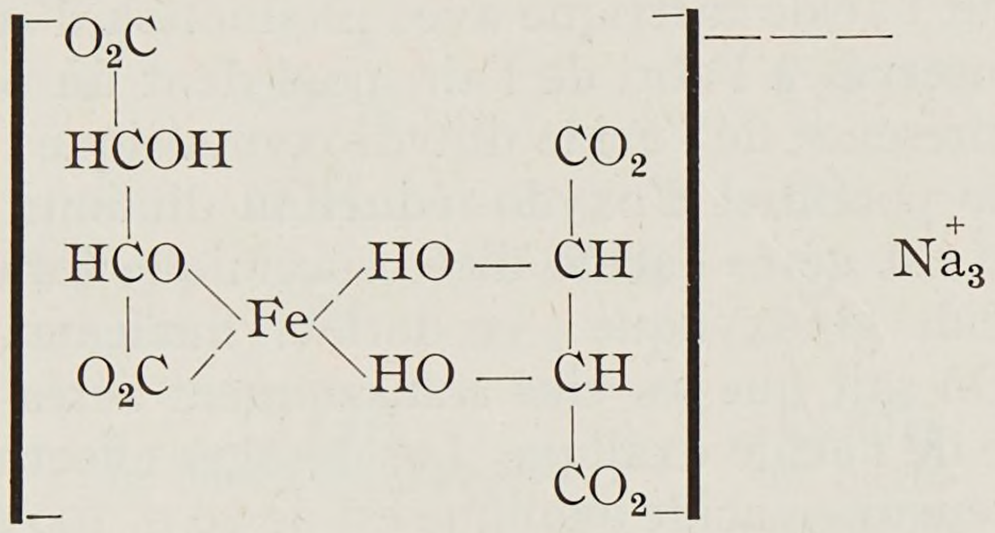
l'acide dihydroxymaléique empêche la précipitation du complexe ; d'ailleurs, sa formation en aérobie demande deux jours. Remarquons que la limite supérieure du pH favorable pour les deux systèmes — acide tartrique + $FeSO_4$ et acide tartrique + complexe — est égal à 5.

Rodopoulo explique l'activité du sel complexe par la stabilité de l'atome du fer dissimulé vis-à-vis de l'oxygène.

Les essais dans les vins ont montré que l'oxydation de l'acide tartrique par les sels ferreux et par le complexe est lente en raison du freinage de la réaction par les quinones et aussi peut-être par une chaîne de réactions d'oxydation ; en tout cas, les quinones oxydent le fer ferreux en fer ferrique. Cette interprétation suppose que le fer ferreux constitue l'atome central du complexe. Toutefois, Rodopoulo reproduit la formule du complexe isolé par Franke [*op. cit.* (11) p. 248]. Dans cet acide ferritartrique la coordinence de l'atome de fer est de 4 ; la molécule d'eau est fortement fixée puisque l'action de l'acide sulfurique est sans effet.



Ce complexe est caractérisé par l'autoréduction de l'atome ferrique. Franke a également préparé, à l'abri de l'air, un complexe tartrique du fer ferreux, de couleur verdâtre stable à l'état solide vis-à-vis de l'oxygène. Cet acide ferroditartrique a la formule suivante :



Ici également la coordinence de l'atome du fer ferreux est de 4. Précisons que Smythe (*op. cit.* (10) p. 255) représente le ferrotartrate par la formule suivante :

Rappelons que, d'après Mathieu (23), la poudre précipitée par Franke ne paraît pas un composé bien défini ; sa couleur verte montre qu'il est oxydé. D'autre part, les solutions du composé ferreux cristallisé ne sont pas stables, elles se troublent, déposent un précipité et prennent une teinte jaune pâle ; l'hydrolyse aboutit à la formation d'un tartrate basique $[TFe(OH)_2]Fe$.

Si l'on sait que les sels du fer sont les catalyseurs actifs de l'oxydation, par contre, on connaît moins, surtout en œnologie, le fait que cette activité

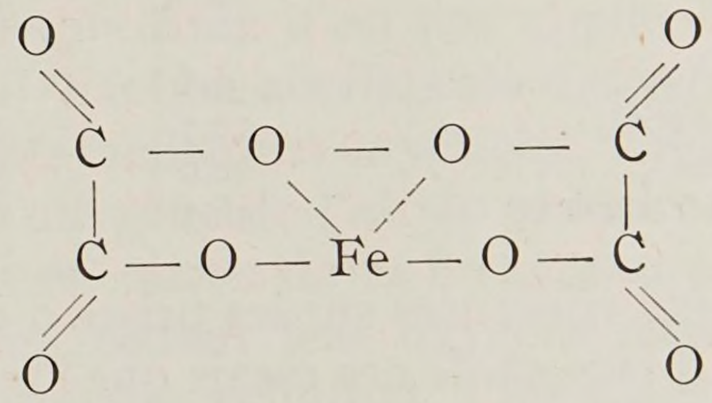
ne disparaît pas toujours avec la formation des complexes. D'une façon générale, la chimie des complexes du fer est peu développée par rapport à celle du cobalt, du chrome, du platine etc.

Il ne rentre pas dans nos intentions de donner ici un exposé complet sur le rôle catalytique des complexes du fer. Ces propriétés catalytiques ne constituent pas une exception, puisque on a constaté que l'activité catalytique d'autres ions métalliques ne disparaît pas après la formatoin des complexes (24 *a-b*).

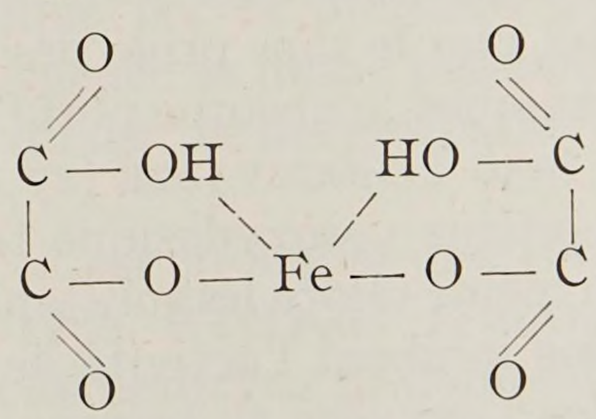
D'après NIKOLAEV (24*c*), l'activité oxydante de l'ion du fer bivalent dans les réactions d'oxydation de l'acide ascorbique s'accroît, si l'ion métallique entre en complexion avec la pyrocatéchine. En outre, les complexes du fer avec l'antipyrine manifestent aussi dans cette réaction une activité considérable. D'après ce savant, l'obtention d'un catalyseur, possédant une activité élevée, est étroitement liée à la formation des particules complexes et à la structure apériodique. Lors de la décomposition de l'eau oxygénée, les complexes actifs du cuivre se caractérisent par l'indice de coordination quatre. Par contre, les complexes de cet élément à indice de coordination six sont peu actifs, car toutes les places disponibles sont occupées.

En général, la stabilité du complexe diminue lorsque son activité catalytique augmente. On sait, d'autre part, que contrairement aux sels ferreux, les composés basiques du fer ferrique possèdent les propriétés tannantes (25) ; en outre, les sels ferriques jouent le rôle de catalyseurs lors de l'oxydation des protéines et des graisses ; toutefois, on ne possède pas des enseignements sur l'influence des substances complexantes sur cette activité catalytique particulière de ces sels.

Sans doute, le complexe isolé par RODOPOULO contient l'atome ferreux. Dans ces conditions, sa formule chimique ne peut être représentée par celle reproduite par l'auteur. D'ailleurs, les preuves expérimentales ne sont pas données ni pour ce complexe, ni pour celui obtenu par l'action du sulfate ferreux sur l'acide oxalique. Pour ce dernier RODOPOULO (26 *a*) a reproduit la formule structurale dans laquelle l'indice de coordination du fer ferreux est également 4 :

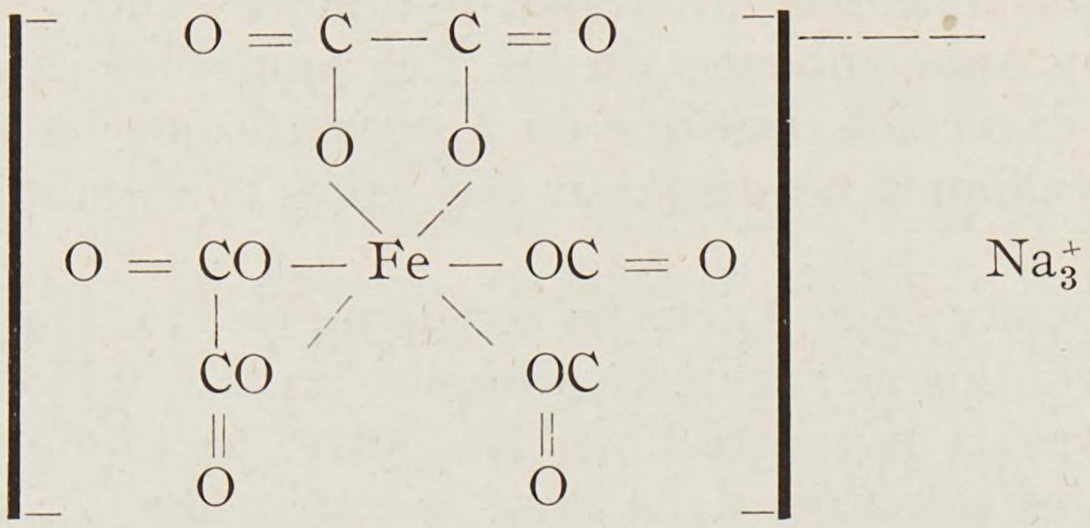


Signalons que, d'après SMITH [*op. cit.* (10) p. 263], ce composé serait obtenu par perte de deux hydrogènes et trois électrons à partir du composé formé en présence de l'ion monooxalique ; la formule de ce composé est la suivante :



Comme on le sait, le radical divalent C_2O_4 a tantôt une coordinence égale à 1, tantôt une coordinence égale à 2.

En choisissant pour le complexe ferrotartrique la formule de l'acide ferritartrique de FRANKE, RODOPOULO aurait dû, pour être logique, attribuer au complexe oxalique la formule analogue à celle du ferritrioxalate de Sodium.



La chimie minérale nous apprend que l'oxalate ferrique $Fe_2(C_2O_4)_3$ est un autocomplexe, c'est-à-dire, un sel, qui bien que pouvant être formulé comme sel simple, présente en solution tous les caractères des complexes $Fe[Fe(C_2O_4)_3]$; en effet, par électrolyse une partie du fer est transportée à l'anode. C'est un fait connu que l'établissement des formules des complexes est laborieux.

Au fait, RODOPOULO a pu isoler les complexes ferreux de différents acides organiques ; en outre, il a étudié leur activité catalytique pour la première fois. Quant à leur composition exacte, l'établissement des formules correspondantes constitue, à notre avis, un problème à résoudre. Nous avons indiqué précédemment que les quinones freinent la réaction de l'oxydation de l'acide tartrique en présence de sulfate ferreux. Malgré ce fait l'oxydation se poursuit grâce à la formation, assez lente, du complexe ferrotartrique, douée de l'activité catalytique. Cette formation est décelée dans les vins expérimentés par l'apparition de la couleur jaune.

Les résultats des essais avec le vin, soit démétallisé par l'oxyquinoléine, soit additionné du sulfate ferreux ou du complexe ferrotartrique, sont reproduits dans le tableau suivant :

	Absorption de l'oxygène en		
	12 h	36 h	72 h
Vin démétallisé	3.5	4.6	5.5
Vin + 0.025 mg $FeSO_4$.....	10.7	20.5	57.8
Vin + 10 mg $FeSO_4$.....	20.6	55.7	121.7
Vin + 10 mg du complexe....	46.3	90.5	165.9

Les expériences ont été effectuées sur les prises d'essai de 3 ml de vin dans l'appareil de WARBURG. Il ressort de ces essais que l'augmentation de la teneur en fer détermine l'oxydation plus prononcée et que le complexe ferrotartrique possède une grande activité catalytique.

Par contre, le vin blanc démétallisé n'absorbe plus l'oxygène. Cette constatation paraît être en contradiction avec les conclusions de TCHOGOVADZÉ. En effet, cet auteur a établi que le vin, privé des fractions aglycones de ses substances colorantes et tanniques, n'absorbe plus l'oxygène même en présence des ions ferreux (27 *a*). En 1950 TCHOGOVADZÉ (27 *b*) a conclu que cette fraction aglycone renferme le sytème peroxydasique thermostable, ne contenant pas des métaux lourds, et en même temps les substances oxydables. L'anhydride sulfureux et l'hydroxyalmine inhibent l'activité de ce système. Le vin, privé des aglucones, n'absorbe plus l'oxygène en présence de l'eau oxygénée, tandis que cette absorption a lieu dans la fraction aglycone séparée. Dans ces conditions les vins, possédant leur propre système peroxydasique, manquent plutôt

de peroxydes que de peroxydases. L'existence de tels catalyseurs peroxydasiques non enzymatiques ne peut plus être mise en doute.

Bezssonov et Leroux (28) ont observé que des solutions d'acide ascorbique, en présence du cuivre, du fer et de l'eau oxygénée, sont susceptibles d'oxyder des substances phénoliques. Le système — acide ascorbique + les ions du fer et du cuivre — constitue un catalyseur pyroxydasique.

Il se peut que dans l'expérience de Rodopoulo l'oxyquinoléine inhibe en même temps le système peroxydasique du vin. Toutefois, Rodopoulo (29) a signalé que l'aglucone séparé d'un vin rouge Saperavi n'absorbe pas l'oxygène à pH 5.5.

Les recherches de Rodopoulo [*op. cit.* (19 *a*)] ont démontré que l'activité des ions ferreux est déterminée par la nature du substratum à oxyder et par sa capacité de former les complexes avec le fer. C'est ainsi que, à côté de l'acide tartrique, les acides citrique, fumarique, oxalique et glycolique forment les complexes du fer, possédant une grande activité catalytique.

L'action catalytique du complexe ferroxalique a été étudié sur les solutions tartriques à l'aide de l'appareil de Warburg.

Rodopoulo explique l'activité catalytique des complexes par la protection du fer ferreux contre l'oxydation. L'action du sulfate ferreux est, au contraire, empêchée par la formation d'un sel ferrique inactif, au point de vue catalytique, dans le cas de l'acide tartrique. Rodopoulo considère que les conceptions sur l'action catalytique du fer, basées sur une simple cession de l'oxygène du fer trivalent aux substances oxydables, ne correspondent pas à la réalité. Dans ce cas, on est, d'après Rodopoulo, en présence d'une induction et non d'une catalyse, puisque le fer trivalent ne possède aucune activité catalytique en présence de l'acide tartrique.

Il faut signaler qu'en général, on définit par le terme « induction chimique » le phénomène d'entraînement d'une réaction par une autre (30) ; le terme « oxydation par l'oscillation des valences » est plus conforme à la réalité dans le cas cité. D'autre part, on sait qu'en général les sels de fer, de manganèse, d'aluminium, de calcium et de magnésium sont susceptibles d'accélérer les oxydations. Si l'oxydation par l'oscillation des valences est possible pour le fer et le manganèse, cette explication n'est pas applicable à d'autres métaux.

D'après Bach (31 *a*), l'action accélérante des sels métalliques se manifeste en présence des substances facilement oxydables. Ces sels accélèrent l'oxydation non par la fixation de l'oxygène de l'air et par sa cession ultérieure aux substances oxydables, mais en raison de la formation avec les peroxydes formés des complexes peroxydes, cédant leur oxygène actif plus facilement et plus rapidement que ces peroxydes primitifs. Plus les substances oxydables sont susceptibles de former les peroxydes, plus leur oxydation est accélérée par les sels. L'action de ces derniers est analogue à celle de la peroxydase.

Dans le cas des ions ferreux, leur action au cours de l'oxydation des diphénols, par exemple, s'explique par la présence du système $Fe^{++} + H_2O_2$; comme on le sait, l'eau oxygénée se forme pendant l'autoxydation de l'hydroquinone même en absence du fer ; ce dernier catalyse l'action de l'eau oxygénée formée.

D'après Bach (31 *b*), il est probable que l'ion ferreux puisse former un peroxyde actif labile du type RTeOOH D'autre part, Nikolaev (*op. cit.* (24 *c*)) signale la formation du peroxyde de cuivre dans la réaction de décomposition des complexes de ce métal en solution d'eau oxygénée. D'ailleurs, la formation de ce peroxyde caractérise la décomposition des complexes actifs ;

les complexes peu actifs se décomposent en formant les produits variés d'oxydation des substances ajoutées.

Signalons que la théorie des oxydations lentes spontanées par l'intermédiaire des peroxydes, établie par BACH (32 *a*) et par ENGLER et WILD (32 *b*), a permis d'expliquer convenablement les phénomènes d'oxydation d'autant plus que sa confirmation expérimentale constitue un fait accompli.

Un exemple typique de la catalyse par les autoxydations est l'oxydation du glucose par les sels céreux, étudiée par JOB (33).

Le catalyseur d'une oxydation peut être le produit de cette oxydation comme l'ont démontré DUPONT et LEVY (34) sur l'autoxydation de l'acide abiétique.

Mme ONSLOW (35) constate en 1920 que les orthodiphénols sont autooxydables ; toutefois, SZENT-GYÖRGYI (36) montre qu'il se forme des dicétones et non des peroxydes ; en outre, le catalyseur n'est pas simplement l'ion fer, mais un complexe ayant un potentiel redox normal de 293 mv. D'autre part, la susceptibilité du complexe vis-à-vis de l'oxygène est beaucoup plus grande que celle de l'ion ferreux.

Le processus de l'oxydation est plus compliqué contrairement aux conceptions simples d'autrefois. L'oxygène activé ne se fixe pas directement sur les oxydants intermédiaires, mais sur les peroxydes formés instables.

L'activation de l'oxygène moléculaire s'effectue sous l'action des substances autoxydables non saturées avec l'ouverture de la double liaison $O = O \rightarrow — O — O —$.

JOB (37) a donné pour le fer ferreux une théorie de cette activation basée sur les changements d'électrovalence. On sait que les polyphénolcatéchines appartiennent à la classe des substances autoxydables.

Dans les moûts de raisin les polyphénolcatéchines sont oxydés en quinones par les polyphénolxydases. RODOPOULO (38) a trouvé dans les moûts aérés jusqu'à 6-10 mg de quinone et 5-10 gammas d'eau oxygénée par litre.

Dans le vin aéré les quinones se forment grâce à l'action catalytique des ions du fer et du cuivre en présence d'oxygène. A l'abri de l'air les quinones sont réduits.

On sait à présent que les quinones jouent le rôle de transporteurs d'hydrogène en présence des substances oxydables, telles que l'acide ascorbique.

BOKOUCHAVA, POPOV et SCHOUBERT (39) ont démontré ce rôle au cours des processus d'oxydo-réduction des plantes.

RODOPOULO [*op. cit.* (26-*b*) p. 218] a effectué les mêmes études sur les jus de raisin et les vins. Avec la disparition des substances oxydables les quinones, corps instables, donnent naissance aux produits de polymérisation. Nous avons déjà signalé le rôle catalytique des ions ferreux au cours de l'oxydation des diphénols [*op. cit.* (31 *b*)]. Il ne nous est pas possible d'exposer plus en détail les points de vue sur les mécanismes des oxydations qui nous intéressent. Disons pour conclure que l'influence des métaux lourds peut différer suivant les conditions des essais.

Lors de l'étude de l'influence du cuivre et du fer sur le procssus de jérézation du vin, SAPONDJIAN et GUÉVORKIAN 40) ont fait des constatations intéressantes. Le cuivre augmente l'accumulation des acétals et des esters neutres. Ce métal est plus favorable à la jérézation. Le fer ferreux et la concentration élevée en fer ferrique sont nuisibles à la qualité du vin. La démétallisation partielle du vin est nettement nuisible. Bien entendu, ces résultats sont valables pour les vins du type Jérez élaborés, comme on le sait, en présence des levures au stade oxydatif.

Le rôle des métaux lourds, tels que le fer et le cuivre, au cours de la maturation du vin dépend des conditions de son évolution. On sait que même dans des solutions simples, le mécanisme de leur intervention apparaît compliqué [*cf. op. cit.* (36)].

On ignore la nature des complexes formés dans les vins, leur susceptibilité à l'égard de l'oxygène ou des oxydants ; cette susceptibilité est variable et peut disparaître soit en fonction des conditions du milieu, soit en fonction des particularités structurales des complexes. Il faut tenir compte de l'action synergique ou antagoniste d'autres métaux, d'autres substances. L'interprétation rationnelle du rôle, de l'activité catalytique des métaux lourds dans les vins est difficile.

Nous allons mettre en relief dans ce qui suit la portée pratique des résultats des recherches de RODOPOULO.

c) Applications pratiques

Les recherches, effectuées par RODOPOULO [*op. cit.* (26 *a*)], ont démontré que l'addition de l'acide dihydroxymaléique dans le vin, conservé ensuite à l'abri de l'air pendant 3 mois, permet d'améliorer son bouquet et son goût. Au début, la petite quantité d'oxygène, se trouvant dans le vin, oxyde cet acide en acide dicétosuccinique ; par la suite, cet acide agit sur l'acide tartrique avec formation d'acide dihydroxymaléique. La présence des acides dicétosuccinique et dihydroxymaléique provoque la diminution du potentiel d'oxydoréduction est de + 350 mv à + 205 mv, ce qui accélère les processus de la maturation du vin. Dans ces conditions l'introduction de ferrotartrate et de ferroxalate pourrait assurer l'évolution favorable de cette maturation. Ces prévisions théoriques de RODOPOULO ont été confirmées par l'expérimentation industrielle. La première série d'expérience a été effectuée en 1951 sur les vins de la récolte de 1950. Ces vins, après une série de manipulations habituelles et après un repos pendant 3 mois dans des citernes émaillées, ont été transvasées dans des bouteilles de manière à laisser un espace libre de 15 ml. Dans ces conditions la quantité d'oxygène dissous ne dépassait pas 0.9 ml par litre, quantité nécessaire pour l'oxydation de l'acide tartrique en présence des catalyseurs introduits. Après agitation les bouteilles ont été conservées pendant 5 mois dans une cave à 15°C. Les quantités de catalyseurs introduits — sels du fer des acides tartrique, fumarique, citrique, glyoxylique — oscillaient entre 5 mg et 10 mg par litre ; la quantité d'acide didroxymaléique ne dépassait pas 5 mg par litre.

A la dégustation on a constaté l'amélioration du goût et du bouquet du vin ; les vins mousseux, préparés partir de ces vins, ont été mieux notés que ceux du contrôle.

Les expériences ont montré que, lors de l'emploi de l'acide dihydroxymaléique, le volume de l'espace libre des bouteilles ne doit pas dépasser 5 ml, la quantité d'oxygène disscus est de 0.3-0. 5 ml par litre ; en présence d'une quantité plus grande d'oxygène l'acide dihydroxymaléique s'oxyde en acide glyoxylique ce qui fait disparaître tout effet de maturité. Les expériences analogues ont été reproduites en 1952. Les quantités des catalyseurs ont été portées à 20 mg par litre ; l'oxalate de fer, utilisé pour la première fois, a donné les meilleurs résultats.Le vin mousseux, fabriqué à partir du vin, additionné de ce sel, a obtenu, au cours de la dégustation, une note supérieure de 1.2 par rapport au vin du contrôle.

L'aération de tels vins détermine la disparition du bouquet, ainsi que des propriétés réductrices. Toutefois, ces vins ainsi aérés et conservés en suite pendant 2-3 mois à l'abri de l'air, retrouvent leurs particularités.

D'après RODOPOULO, le tartrate et l'oxalate de fer possèdent une valeur pratique. Etant donné que ces complexes contiennent 30 p. 100 de fer, l'introduction du métal sous cette forme correspond à 5-6 mg par litre. En outre, ces catalyseurs, étant insolubles, sont facilement éliminés pendant la filtration et le dégorgeage.

Leur emploi est indiqué au cours de la maturation des vins dans les citernes émaillées ou dans les cuves en béton armé ; en effet, dans ces conditions la pénétration de l'oxygène de l'air est limitée par rapport à celle liée avec la conservation du vin dans les fûts de chêne.

En se basant sur les résultats de ses essais, RODOPOULO recommande aux vignerons d'effectuer les soutirages, les collages, la filtration des vins à l'abri de l'air de manière à limiter leurs teneurs en oxygène. Sans doute, ces conseils s'appliquent en premier lieu aux vins blancs puisque les essais ont été effectués sur les vins destinés à la champagnisation. Ce fait n'exclut point la nécessité de la régulation de l'accès de l'oxygène pendant la maturation des vins rouges. RODOPOULO (41) a effectué en 1950 les essais comparatifs à l'échelle industrielle sur les vins mousseux en commençant par la fermentation primaire. Les vins, obtenus à l'abri de l'air avec un minimum d'admission d'oxygène égal à 9 ml de ce gaz par litre au total au cours de toutes les opérations, ont été reconnus supérieurs par rapport à ceux élaborés par le procédé habituel, comprenant l'admission de 30 ml d'oxygène par litre.

Cette amélioration des qualités des vins est liée, en particulier, à la formation de l'acide dihydroxymaléique. Tous ces essais constituent un bel exemple d'application pratique des enseignements issus de l'expérimentation scientifique.

B. — Chromatographie sur papier et évolution des acides organiques au cours de la fermentation du moût de raisin et de la maturation des vins

a) Séparation et dosage des acides organiques du jus de raisin et de vin par chromatographie sur papier

L'application de la chromatographie sur papier aux vins a été faite en 1950 par SISSAKIAN et BEZINGUER (42). A son tour, RODOPOULO a étudié la séparation et le dosage des acides organiques du moût et du vin au moyen de cette méthode (43). On sait que les premières chromatographies sur papier des acides organiques sont dues à LUGG et OVERELL (44). RODOPOULO traite 50 ml du moût ou du vin à l'aide de la poudre de peau ou de charbon activé afin d'éliminer les substances tannantes et colorantes ; les acides volatils sont éliminés par entraînement à la vapeur d'eau. Le résidu obtenu est acidulé et traité par l'éther pendant 90 heures. L'extrait éthéré des acides organiques permet d'obtenir 25 ml de leur solution aqueuse.

Pour la chromatographie sur papier les concentrations des acides doivent être de 40 à 80 µg. RODOPOULO emploie le papier à filtrer ordinaire, lavé par le solvant employé pour la chromatographie, qui est l'alcool butylique normal saturé d'eau et contenant 5 p. 100 d'acide formique. Les taches des acides sont

relevées avec la solution alcoolique à 0.04 p. 100 de vert de vert de bromocrésol ou de bleu de bromocrésol.

Les dosages des acides organiques dans les taches obtenues ont été effectués à l'aide des méthodes sensibles. L'acide citrique a été déterminé d'après KOMETIANI et STOROUA (45) suivant la modification de NATELSON (46) ; l'acide malique selon HUMMEL (47), l'acide lactique d'après BARKER et SUMMERSON (48), l'acide succinique suivant KREBS (49) et l'acide oxalique suivant ZALESKII (50) ; comme on le sait, les deux dernières méthodes sont biologiques. L'acide tartrique a été dosé par le titrage avec la solution alcaline.

De BETTIGNIES (51) a appliqué également la chromatographie sur papier à la séparation des acides organiques dans les vins de Muscadet, en utilisant le procédé de CHEFTEL, MUNIER et MACHEBŒUF (52). Cette méthode chromatographique permet de suivre rapidement l'évolution de la fermentation malolactique pendant la vinification. En outre, cet auteur a étudié les chromatogrammes à l'aide de la lumière de WOOD.

RIBÉREAU-GAYON jr (53, *a*, *b*) a donné, à son tour, les procédés chromatographiques pour caractériser la fermentation malolactique des vins et pour évaluer l'acide malique.

L'application de la chromatographie sur papier aux jus de raisin et aux vins a permis à RODOPOULO de faire d'intéressantes constatations. Nous allons les exposer brièvement dans ce qui suit.

b) Evolution des acides organiques au cours de la fermentation du moût de raisin et dans les vins

RODOPOULO [*op. cit.* (43-*a*)] a déterminé à l'aide de la chromatographie les acides organiques du moût et du vin GOROULI-MTZVANÉ. Voici les résultats obtenus.

Acide	Teneur en g/l avant la fermentation du moût	Teneur en g/l dans le vin
Tartrique	6.35	5.85
Malique	1.50	1.10
Succinique	—	0.75
Citrique	0.23	0.35
Oxalique	0.085	0.087

On remarque la diminution bien connue de l'acide tartrique, la disparition partielle de l'acide malique, l'augmentation de la teneur en acide citrique.

RODOPOULO a vérifié la formation de l'acide citrique à partir de l'acide malique en effectuant les essais avec les levures lavées mises en présence de l'acide malique.

L'acide malique s'oxyde en acide oxalacétique qui par décarboxylation donne naissance à l'acide pyruvique. Par condensation de ce dernier avec une autre molécule de l'acide oxalacétique se forme l'acide citrique.

RODOPOULO a donné également les résultats d'une autre série d'essais [*op. cit.* (43 *b*), p. 546].

Acide	Teneur en g/l Moût	Teneur en g/l Vin
Tartrique	6.55	5.98
Malique	1.68	1.165
Succinique	—	0.427
Lactique	—	0.320
Citrique	0.21	0.305
Oxalique	0.085	0.057 (?)

Nous remarquons la formation de l'acide lactique ; cette fois, sauf erreur, la teneur en acide oxalique est en diminution.

Tous ces résultats obtenus confirment les constatations faites, en particulier, par PEYNAUD (54). En effet, la levure alcoolique provoque toujours la fermentation lactique ; d'autre part, la production d'acide succinique est continue au cours de la fermentation. D'après RODOPOULO [*op. cit.* (43 *a*) p. 11], l'acide succinique se transforme, si le vin est laissé sur les levures, en présence de l'air, en acide fumarique.

Quant à l'acide citrique, PEYNAUD remarque que « il n'est pas non plus impossible que l'acide citrique soit formé aux dépens des autres acides organiques du moût «. RODOPOULO a démontré qu'il se forme à partir de l'acide malique ; en outre, il a mis en évidence la présence de l'acide oxalique.

Il est bien évident que la méthode chromatographique de séparation et de dosage des acides organiques dans les moûts et les vins est compliquée, demande un appareillage et des réactifs spéciaux. Ces circonstances ont incité, RODOPOULO (55) à sélectionner des méthodes chimiques de dosage de ces acides plus pratiques et plus commodes. Leur exposé dépasse le cadre du présent mémoire.

Lors de la dernière session scientifique tenue à l'Institut « Magaratch » en Crimée, RODOPOULO (56) a fait l'exposé des récentes recherches sur les transformations des acides organiques au cours de la fermentation du moût et au cours de la champagnisation ; ces travaux ont été effectués au moyen des atomes marqués et de l'analyse chromatographique. Pour le moment nous ne possédons pas d'autres renseignements concernant les résultats de ces recherches.

Signalons, d'autre part, qu'en France, BARAUD (57) a publié tout récemment une importante étude concernant les dérives naturels de l'acide tartrique. Nous avons appris sa parution au moment de la mise en impression de notre mémoire, ce qui nous empêche de reproduire les conclusions auxquelles ont abouti les recherches de cet auteur.

IV. — CONCLUSION

Le vin est le siège de réactions chimiques compliquées où l'oxydation de l'acide tartrique, catalysée par le fer ferreux, occupe une place importante. Malgré l'intérêt considérable des dérivés de cet acide pour la maturation des vins, la connaissance exacte de leurs propriétés, issue des recherches modernes, constituait l'apanage de quelques initiés.

Le but de ce mémoire est d'essayer de faire le point de la question et de montrer les conséquences pratiques découlant des travaux particulièrement intéressants de RODOPOULO. Il ressort de l'exposé que les anciennes conceptions ne peuvent être conservées dans leur totalité.

BIBLIOGRAPHIE

(1) GENEVOIS (L.). — Matières colorantes et vieillissement des vins. *Revue Ferm. Ind. Alim.* **6**, 111, 1951.
(2) FENTON (J.). — *J. Chem. Soc. London*, **65**, 899, 1894 ; **75**, 10, 1899 ; **87**, 804, 1905.
(3) NEUBERG (C.), SCHWENK (E.). — *Biochem. Z.*, **71**, 104, 1915.
(4) SCHMALFUS (H.), BARTHMEYER. — *Z. phys. chem.*, **160**, 196, 1926.

(5) Wieland (H.), Franke (W.). — Ueber den Mechanismus der Oxydation Vorgänge. *Ann.* **461**, 117, 140, 1928.
(6) Manchot (W.). — *Z. anorg. chem.* **27**, 420, 1901 ; **34**, 2479, 1901. — *Ann. Chem.*, **325**, 93-105, 1902-1903. — **480**, 179, 1927.
(7) Warburg (O.). — *Bioch. Z.*, **152**, 479, 1924.
(8) Goard (A.), Rideal (E.). — *Proc. Roy. Soc. London*, série 1, **105**, 135, 1924.
(9) Baudisch (O.), Welo (L.). — Mechanism of catalytic action of iron salts. *J. Biol. Chem.*, **61**, 261, 1924.
(10) Smythe (C.). — The mecanism of iron catalysis in certain oxydations. *J. Biol. Chem.*, **90**, 251, 1931.
(11) Franke (W.). — Über die Eisenkomplexe der Weinsäure. *Ann. Chem.*, **486**, 242, 1931.
(12) Cupta (M.). — The molecular configuration on the aliphaticdibasic acides $C_4H_4O_6$ $2H_6O$ *J. Amer. Chem., Soc.*, **75**, n 22, 6312, 1953.
(13) Hartree (E.). — On the configuration of the so called dihydroxymaleic acid. *J. Amer. Chem. Soc.*, **75**, n° 24, 6244, 1953.
(14) Genevois (L.), Gay (L.). — Sur les propriétés de l'acide dioxymaléique P. V., *Soc. Sc. Phys. Nat.*, Bordeaux, 2 février, 1939.
(15) Gatet (Mlle L.), Genevois (L.). — Sur le pouvoir réducteur des vins. *Bull. Soc. Chim Fr.*, **8**, 485, 1941.
(16) Genevois (L.), Ribéreau-Gayon (J.). — Le vin, 72, 1947, Paris, Hermann édit.,.
(17) Baraud (J.). — *a*) Une nouvelle méthode de dosage de l'acide ascorbique. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **18**, 837, 1951. — *b*) Dosages simultanés de l'acide ascorbique de l'acide dihydroxymaléique et de la réductone *Ibidem*, **20**, 521, 1953. — *c*) La réaction de la tartrazine appliquée à l'étude des vins. *Ibidem*. **20**, 525, 1953.
(18) Ziegler (J.), Locher (M.). — *Ber.* **20**, 836, 1887 (d'après Baraud J. renvoi bibl. (17*a*) p. 837).
(19) Rodopoulo (A.). — *a*) Oxydation de l'acide tartrique dans le vin en présence des sels des métaux lourds (activation de l'oxygène par le fer) *Izvestiya Akad. Naouk* S. S. S. R. série biol. n° 3, 115, 1951. — *b*) Sur les processus oxydo-réducteurs au cours de l'élaboration du vin. *Vinodélié i Vinogradarstvo* S. S. S. R., n° 1, 21, 1952.
(20) Deibner (L.). — *a*) Activité physiologique du vin et du raisin et le rôle de leur composés polyphénoliques d'après les récents travaux. *Ann. Tech. Agr. I. N. E. A.* **3**, n° 1, 69, 1954. — *b*) Œnométrie, son état actuel, son rôle dans la prévision de certains phénomènes œnologiques. *Revue Ferm. Ind. Alim.*, **9**, n° 4, 158 ; n° 5, 196, 1954.
(21) Fosse (R.), Hieule (A.). — Réaction colorée considérée comme spécifique de la forme aldéhyde se produisant avec l'acide glyoxylique *C. R. Ac. Sci. Fr.*, **179**, 636, 1924.
(22) Kolesnikov (P.). — *Izvestiya Akad. Naouk.*, S. S. S. R., **3**, 283, 1949.
(23) Mathieu (J.). — Composés tartriques de quelques métaux bivalents. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1**, 1713, 1934.
(24) *a*) Nikolaev (L.), Kobozev (N.). — *J. Chim. Phys.*, S. S. S. R., 323, 1945.
b) Nikolaev (L.). — *J. Chim. Phys.* S. S. S. R., n° 12, 1427, 1951.
c) Nikolaev (L.). — Sur la relation entre l'activité catalytique et la structure des composés complexes. *J. Chim. Phys. Fr.*, **51**, n° 11-12, 752, 1954.
(25) Michaïlov (A.). — Chimie des substances tannantes et des processus du tannage, 293, 298, 1953, Moscou, Legpromizdat éd.
(26) Rodopoulo (A.). — *a*) Rôle des sels de fer des acides organiques au cours de la maturation et du vieillissement du vin. *Vinodélié i Vinogradarstvo*, n° 1, 9, 1953. — *b*) Systèmes oxydatifs fermentatifs et non fermentatifs

du vin. *Biochimiya vinodéliya*, nº 4, 223, 1953, Moscou, *Ac. Sc.* S. S. S R., édit.

(27) Tchogavadzé (C.). — *a*) Rôle de la fonction aglucone des substances colorantes et tanniques au cours de la maturation des vins. *Vinodélié i Vinogradarstvo*, nº 6, 14, 1948. — *b*) Maturation et veillissement du vin. *Vinédélié i Vinogradarstvo*, n 9, 10, 1950.

(28) Bezssonov (N.), Leroux (H.). — L'action peroxydasique de la vitamine C sur le phénol. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **28**, 286, 294, 608, 1946. — Activité enzymatique de la vitamine C. *Z. Vitaminforsch*, **17**, 1, 1946.

(29) Rodopoulo (N.). — Rôle des substances tanniques pendant l'oxydation du moût et du vin. *Vinodélié i Vinogradarstvo*, nº 9, 20, 1950.

(30) Wurmser (R.). — Oxydations et réductions, 132, 1930, Paris, Les Presses Universit. de France édit.

(31) Bach (A.). — *a*) Chimisme des processus de respiration. *J. Soc. Russe Phys-Chim.*, **44**, n º 1-2, 1912. Rec. Trav. sur la Chimie et la Biochimie, 95, 1950, Moscou, *Ac. Sc.*, S. S. S. R. édit. — *b*) Zur Frage nach dem Mechanismus der Eisen-Katalyse bei Autoxydations Prozessen *Ber.*, **65**, 1788, 1932.

(32) *a*) Bach (A.). — Du rôle des peroxydes dans les phénomènes d'oxydation lente. *C. R. Ac. Sc. Fr.*, **124**, 951, 1897 ; Mon. Sc. **11**, 479, 1897. — *b*) Engler, Wild,. — Ueber die sogennante Aktivierung des Sauerstoffes und Ueber Superoxydbilung. *Ber.*, **30**, 1669, 1897.

(33) Job (A.). — Glucose et carbonate de cérium ; sur un nouveau mécanisme d'oxydation provoqué. *C. R. Ac. Sc. Fr.*, **134**, 1052, 1902.

(34) Dupont (G.), Levy (J.). — Sur l'autoydation de l'acide abiétique. *C. R. Ac. Sc.*, **189**, 763, 1929.

(35) Onslow (Mme M.). — The nature of the enzymes associated with certain direct oxydising systemes in plants. *Bioch. J.*, **14**, 536, 1920.

(36) Szent-Györgyi (A.). — Ueber den oxydations mechanismus der Kartoffeln. *Bioch. Z.* **162**, 399, 1925. — Observation of the fonction of peroxydase systems and the chemistry of the adrenal cortex. *Bioch. J* **22**, 1387, 1928.

(37) Job (A.). — Les réactions intermédiaires dans la catalyse, 1926, 2e Conseil de Chimie Solvay. (d'après le renvoi (29)).

(38) Rodopoulo (A.). — Détermination des peroxydes dans le moût et le vin. *Vinodélié i Vinogradarstvo*, nº 5, 7, 1953.

(39) Bokouchava (M.), Popov (V.), Schoubert (T.). — Rôle des substances tannantes au cours des processus oxydo-réducteurs des plantes. *Doklady Ak. Naouk.*, S. S. S. R., **76**, nº 8, 439, 1951.

(40) Sapondjian (S.), Guevorkian (Ch.). — Influence des métaux lourds sur le processus de jérézation du vin. *Vinodélié i Vinogradarstvo*, S. S. S. R., nº 11, 18, 1953.

(41) Rodopoulo (A.). — Améliorer la technologie du champagne en cuve close. *Vinodélié i Vinogradarstvo*, nº 11, 33, 1950.

(42) Sissakian (N.), Bezinguer (E.). — Sur la teneur en amino-acides des vins de raisin. *Biochimiya vinodéliya*, **85**, 1950, *Ac. Sc.*, S. S. S. R.

(43) Rodopoulo (A.). — *a*) Chromatographie sur papier des acides di et tricaboxaliques du moût et du vin. *Vinodélié i Vinogradarstvo* S. S. S. R., nº 8, 8, 1952. — *b*) Séparation et dosage des acides organiques du vin et du moût par la méthode chromatographique. *Biochymiya*, S. S. S. R., **18**, nº 5, 544, 1953.

(44) Lugg (I.), Overell (B.). — Nature, **160**, 87, 1947.

(45) Kometiani (P.), Storoua (g.). — Détermination microchimique de l'acide citrique. *C. R. Ac. Sc., S. S. R. de Georgie*, **5**. 5, 1944.

(46) Natelson (S.). — *J. Biol. Chem.*, **170**, 2, 597, 1947.

(47) Hummel (I. — *J. Biol. Chem.*, **180**, 3, 1425, 1949.

(48) Barker (I.), Summerson (W.). — *J. Biol. Chem.*, **138**, 535, 1941.

(49) KREBS (N.). — *Bioch. J.*, **31**, 2095, 1937.
(50) ZALESKII. — *Bioch. Z.*, **33**, 449, 1911.
(51) de BETTIGNIES (G.). — L'analyse chromatogr. appliquée aux vins. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, Oct. 920, 1953.
(52) CHEPTEL (R.), MUNIER (R.), MACHEBŒUF (M.). — Microchromatographie de partage sur papier des acides aliphatiques hydro-solubles et non volatils. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **33**, 840, 1951.
(53) RIBÉREAU-GAYON (P.). — *a*) Méthode simple et expressive de caractérisation de la fermentation malolactique des vins. *C. R. Ac. Sc.*, nº 17, 807, 1953. — *b*) Evaluation de l'acide malique des vins par chromatographie sur papier. *Ann. Fals. Fraudes*, **47**, Janv-Févr., 3, 1954.
(54) PEYNAUD (E.). — Contribution à l'étude biochimique de la maturation du raisin et de la composition des vins. Thèse Ing-Docteur, Bordeaux. 1946 ; *Ind. Agr. Alim.*, **69**, 87, 514, 1947
55) RODOPOULO (A.). — Dosage des acides di et tri-carboxyliques dans le, raisin le moût et le vin. *Vinodélié i Vinogradarstvo*, nº 3, 5, 1954.
(56) OCHREMENKO (N.). — Session scientifique jubilaire. *Vinodélié i Vinogradarstvo*, nº 1, 56, 1955.
(57) BARAUD (J). — Étude des dérivés naturels de l'acide tartrique. Thèse Sc. Nat. Bordeaux, 1954, Paris, Masson édit ; Ann. Chim. *9*, 535-604, *1954*. (D'après Ball. Anal. C. N. R. S., réf. 16-26102, *15*, nº 4, 1 p, *1955*).

Tout récemment, K. HENNIG et S. FLINTJE ont effectué les recherches sur le dosage des acides organiques du vin à l'aide de la chromatographie sur papier et de la méthode retentiométrique. (Papierchromatographische und retentiometrische Untersuchung der Säuren des Weines, Der Deutsche Weinbau, Die Weinwissenschaft, *8*, nº 6, 1954 ; *9*, nº 1, 1955). Egalement, G. MARSH et C. KEAN ont utilisé la chromatographie sur papier pour l'étude des mêmes acides et, en particulier, de l'acide tartrique isolé des vins secs à l'aide d'échangeurs d'ions. (Application of chromatographic methods to organic acids in wine. Proc. Amer. Soc. Enol. 157, 1951 ; Wines and Vines, *33*, nº 3, 19, 1952). Nous n'avons pas pu signaler ces publications dans le texte de notre mémoire déjà envoyé à l'impression.

CHRONIQUE DES LIVRES

MANUEL DES JUS DE FRUITS

PAR

Henri GACHOT

M. GACHOT vient de faire paraître la deuxième édition de son *Manuel des jus de fruits*.

Celui-ci s'adresse spécialement au producteur et à l'utilisateur des jus de fruits. Le texte de la première édition est repris intégralement mais est augmenté d'une centaine de pages. La documentation est plus importante et plus variée.

L'étude de la composition des jus de fruits est complétée par l'appréciation des tanins et des matières tannoïdes. La documentation mentionne en outre les récentes acquisitions de l'industrie des jus de fruits, telle que l'upernisation pour la stabilisation des jus ; de nouveaux appareillages.

Sur le plan scientifique, certains phénomènes ou certaines actions sont longuement décrits : brunissement des jus de pommes, pH, action du SO_2, etc...

Ce manuel est le seul en langue française qui puisse guider le producteur de jus de fruits, au cours de toutes les étapes de la fabrication, depuis la cueillette du fruit jusqu'à la vente du jus.

De chapitre en chapitre, l'auteur traite tout ce qui touche le jus de fruits : valeur hygiénique, fabrication, conservation, analyse, commerce et utilisation des sous-produits.

Voici les différents sujets qui sont développés en détail :

— Valeur alimentaire et thérapeutique des jus de fruits.

— Développement de l'industrie des jus de fruits dans le monde.

— Étude des différents jus : raisins, pommes, agrumes, ananas, fruits nobles, cerises, pêches, abricots, tomates.

— Élaboration du jus à partir du fruit : lavage, pressurage, clarification, filtration, désaération, homogénéisation.

L'auteur décrit les différents appareils utilisables, en expose le principe, puis le fonctionnement.

— Méthodes de stérilisation du jus : les anciennes et les plus récentes. Un chapitre entier est réservé au mutage et à la désulfitation.

— Récipients de conservation : étude des divers récipients, façon de les stériliser, appareils de remplissage et de bouchage.

— Lutte contre la contamination microbienne.

— Diverses formes d'utilisation des jus de fruits concentrés, poudre boisson gazeuse.

— Utilisation des sous-produits : extraction et utilisation de la pectine des marcs de pommes, de l'huile des pépins de raisins, de la pectine des huiles essentielles et l'acide citrique des déchets d'agrumes.

— Analyse rapide des jus, qui permettra de contrôler la qualité du jus au cours de sa fabrication et de sa conservation.

— Les différentes lois qui règlent la fabrication et la vente des jus de fruits : manipulations autorisées et non autorisées, normes de qualité.

— Organismes qui défendent les intérêts des jus de fruits.

Le dernier chapitre est très utilement réservé à la préparation familiale des jus.

On peut voir que M. GACHOT ne laisse de côté aucune question se rapportant de près ou de loin à l'industrie des jus de fruits.

Ce manuel sera très utile. En bref, il met en relief l'intérêt hygiénique et économique de l'industrie des jus de fruits et la façon pratique d'orienter et d'intensifier cette industrie encore trop peu développée en France.

Certains pourraient lui reprocher de ne pas avoir donné à certains chapitres un développement plus scientifique. Ce ne serait plus un manuel.

Toutefois, comme il s'agit d'un ouvrage en langue française, nous aurions préféré l'expression de la densité soit en unité décimale, soit en degré Baumé et non pas en degré Oechlé (p. 83).

Autre détail, plus important celui-ci, la distinction entre hybrides et viniferas, n'est pas assez nette dans la présentation (p. 85).

Le Directeur-Gérant : B. LACLAVIÈRE.

Imprimerie BUSSIÈRE à Saint-Amand (Cher), France. — 27-I-1956.
Dépôt légal: 1er trimestre 1956 *N° d'impression: 119*

CONTRIBUTION A L'ÉVALUATION DU POUVOIR TAMPON DE QUELQUES MILIEUX PARTICULIERS, TELS QUE LES VINS ET LES SOLS

PAR

N. C. ROUSSOPOULOS

Professeur titulaire de Chimie Agricole
à l'École Supérieure Agronomique d'Athènes,
ancien professeur titulaire à l'Université de Thessaloniki, Grèce

Dans un précédent mémoire (1) nous avons établi que le pouvoir tampon d'un liquide tel que le vin (à acidité organique faible partiellement neutralisée par des bases fortes fixes), peut être calculé, à partir de son acidité de titration et de son alcalinité des cendres, au moyen de la formule :

$$R = \frac{dB}{dp\mathrm{H}} = 2{,}303 \frac{(\overline{A})\,(AH)}{(\overline{A}) + (AH)} \quad (1)$$

dérivée de celle de HENDERSON-HASSELBALCH, applicable, comme on sait, à un acide monoprotonique partiellement salifié AH.

Dans la formule précédente $R = \frac{dB}{dp\mathrm{H}} =$ le pouvoir tampon, $(\overline{A})$ l'alcalinité des cendres et (AH) l'acidité de titration (acidité libre), grandeurs toutes exprimées en méq/litre.

Or, à partir de la formule (I) et de celle de HENDERSON-HASSELBALCH :

$$p\mathrm{H} = p\mathrm{K} + \log \frac{(\overline{A})}{(AH)} \quad (II),$$

nous tirons :

$$(AH) = \frac{R}{2{,}303} (1 + 10^{(p\mathrm{K}-p\mathrm{H})}) \quad (III)$$

et

$$(\overline{A}) = \frac{R}{2{,}303} (1 + 10^{-(p\mathrm{K}-p\mathrm{H})}) \quad (IV)$$

mais : $(\overline{A}) + (AH) = C =$ acidité totale (libre et combinée) en méq/litre : d'où

$$C = \frac{R}{2{,}303} (2 + 10^{(p\mathrm{K}-p\mathrm{H})} + 10^{-(p\mathrm{K}-p\mathrm{H})}) \quad (V).$$

De cette dernière formule, il résulte que le pouvoir tampon de la solution d'un acide faible AH partiellement neutralisé (c'est-à-dire pour un pK déterminé), dont on connaît la concentration (*c*) en acide total (libre et combiné), ne dépend que de son pH, c'est-à-dire que, dans le cas d'un tel milieu, le pH ne mesure seulement pas l'acidité réelle du milieu, mais aussi son pouvoir tampon, soit la tendance du milieu à conserver son pH et, par suite, toutes les propriétés dépendant de cette grandeur (par exemple, dans le cas d'un vin à son propre pH, résistance aux maladies ou autres altérations, aspect, etc...).

Or, pour les vins d'une région déterminée, le pK, calculé au moyen de la formule (II), est presque constant (en général, plus grand que leur pH et égal, en moyenne, à 3,9).

Ainsi, pour les vins, tout au moins à leur pH naturel (c'est-à-dire sans addition préalable d'acides ou de bases), nous devons observer, conformément à la formule (V), écrite comme ci-dessous :

$$R = \frac{dB}{dpH} = \frac{2{,}303\ C}{2 + 10^{(pK-pH)} + 10^{-(pK-pH)}} = (V)$$

que : 1° le pouvoir tampon est proportionnel à la concentration totale (*c*) de l'acide (c'est-à-dire libre et combiné).

2° Que ce pouvoir est maximum pour pH = pK.

Dans ce cas, d'après la formule (V) : $R = \frac{2{,}393\ C}{4} = 0{,}576\ C$ (c'est-à-dire pour une concentration (C) diximème normale, il ne peut pas dépasser 100 méq × 0,576 = 57,6 cm³ de NaOH normale/litre).

3° Pour un pH donné, pour pH < pK et pour une concentration (*c*) donnée, le pouvoir tampon du milieu considéré est d'autant plus petit que le pK est plus grand et vice-versa, tandis que l'on observe exactement le contraire pour pH > pK.

4° Pour un pK donné, pour pK > pH et avec une concentration (*c*) donnée le pouvoir tampon croît avec le pH et diminue lorsque ce dernier diminue ; tandis que l'on observe exactement le contraire si pK < pH (contrairement à ce que l'on a eu (3)). Dans les cas (3) et (4), les courbes correspondantes théoriques du pouvoir tampon, en fonction du pH, descendent systématiquement de deux côtés du maximum, les deux branches descendantes tendant, au commencement rapidement et ensuite lentement vers zéro.

5° Dans le cas où pK > pH (comme dans les vins) et pour une concentration (C) donnée, le pouvoir tampon diminue lorsque la différence (pK-pH) augmente et augmente lorsque cette différence diminue (tandis que c'est le contraire qui arrive si pK < pH).

D'autre part, le tableau (I) donne, toujours, d'après la formule (V), et pour une concentration ordinaire C = 125 méq/litre, le pouvoir tam-

pon d'un vin (en méq/litre) suivant différentes valeurs de la différence (pK — pH) rencontrées dans la pratique.

TABLEAU I

$(p\mathrm{K} - p\mathrm{H})$	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1
$\mathrm{R} = \frac{d\mathrm{B}}{dp\mathrm{H}}$	72	71	68,3	64	58,6	52,5	46,2	40	34	28,6	23,8

En multipliant les valeurs de R correspondant aux différentes valeurs de (pK — pH) de ce tableau, par l'acidité totale (c), en méq/litre, et en divisant par 125, nous avons le pouvoir tampon d'un vin donné.

Quant aux valeurs théoriques de R, pour différentes valeurs de pH, dans le tableau (II), elles correspondent aux solutions d'un acide faible AH, partiellement combiné, ayant un pK égal à 3,9, amenées aux pH extrêmes du tableau par addition d'acides ou de bases fortes, et à condition que la formule de HENDERSON-HASSELBALCH soit toujours valable. Elles ont été calculées, toujours au moyen de la formule (V), pour C = 125 méq par litre.

Pour être donc, ramenées à une concentration (C) (en méq/litre) elles doivent être multipliées encore par (c) et divisées par 125.

TABLEAU II

$p\mathrm{H}$	0	1	2	3	3,9	4	5	6	7	8	9
$\mathrm{R} = \frac{d\mathrm{B}}{dp\mathrm{H}}$	0,04	0,4	3,5	28,6	72	71,1	19,6	2,2	0,27	0,023	0,0023.

Mais le tableau (II) applicable aux vins, à leur pH naturel, ne peut pas être appliqué à des vins amenés aux pH extrêmes du tableau, par addition d'acides ou de bases fortes, même si l'équation de HENDERSON-HASSELBALCH restait toujours valable, à ces pH extrêmes.

En effet, dans ce dernier cas, au contraire de ce qui vaut pour une solution d'un acide faible, AH unique, on a une covariance du pK parallèle à celle du pH par suite de l'élimination successive des acides organiques les moins forts du vin (qui se transforment pratiquement, complètement en molécules non dissociées), dans le cas de l'addition d'acides forts, ou des acides les plus forts du vin(qui se transforment pratiquement, complètement en sels) dans le cas de l'addition de bases fortes, et de l'apparition ainsi, du pouvoir tampon d'autres composants du vin (comme des phosphates et des polyphénols, vers pH = 7,5, des sucres et surtout du glucose, à partir de pH = 9, etc) (2).

Ainsi, les courbes relatives aux vins, en contradiction avec les valeurs extrêmes du tableau (II), passent par un minimum (1 — 3 cm³ de NaOH normale/litre) vers pH = 7,5 pour monter de nouveau à partir de pH = 9 (3).

Mais des tableaux comme le tableau (I) et le tableau (II), et plus généralement la formule (V) peuvent être appliqués aux vins, le tableau I plus strictement et le tableau II pour une classification approximative des vins d'une région dont le pK s'éloigne très peu de la valeur moyenne (3,9 dans notre exemple).

Ainsi, d'après ce qui précède, les vins d'une région donnée peuvent tout au moins approximativement, être classés au point de vue pouvoir tampon, d'après leur pH naturel, lequel en dehors de leur acidité réelle mesure aussi ce pouvoir (sous les réserves énoncées).

LE CAS DES SOLS

Il paraît, à première vue, difficile l'application de ce qui précède au cas, aussi, des sols, par remplacement, dans les formules précédentes, de (A) par S (bases échangeables, en méq/100 g sol) et de (AH) par (T — S) (T = capacité d'échange en méq/100 g sol).

En effet, dans le cas du complexe absorbant du sol, nous avons affaire à des colloïdes, dont quelques-uns doivent être considérés comme des acides forts (4).

De plus, dans ce cas, interviennent aussi des équilibres Donnan (5) comme des métastructures (6) des réactions à l'intérieur des feuillets élémentaires des argiles (7) et, à partir d'un pH assez bas, des altérations profondes de ces derniers (8) etc...

D'autre part, les grandeurs S et T ou (T — S) sont déterminées par remplacement des cations échangeables du complexe (dans le cas de T y compris les ions hydrogène) et dosage dans une phase liquide, après un temps plus ou moins long, au moyen de solutions tamponnées à différents pH suivant les divers auteurs. De même la détermination du pH est faite sur la suspension du sol soit dans l'eau pure, soit dans KCl normal, etc... c'est-à-dire dans des conditions d'équilibre (entre phase liquide et solide) différentes des conditions de détermination de S et T.

Or, dans la formule de Henderson-Hasselbalch, la concentration (H) et les concentrations (A) et (AH) se rapportent à l'état d'équilibre entre ces trois concentrations (ou mieux, activités), dans une même phase liquide unique. Il en devait donc être de même, théoriquement, pour le cas des sols.

Cependant, des auteurs américains, frappés par le fait que les courbes de neutralisation de l'acidité des sols rappellent la courbe de neutralisation d'un acide monoprotonique faible AH, ont déjà appliqué la formule de Henderson-Hasselbalch aux sols et à leurs constituants actifs, tels que les argiles.

Ainsi, R. BRADFIELD (9) trouve que dans le cas d'argiles étudiées par lui, le pK « apparent » calculé au moyen de formule :

$$pH = pK + \log \frac{\text{bases échangeables}}{\text{capacité d'échange} - \text{bases échangeables}}$$

ou $$pH = pK + \log \frac{S}{T - S} \quad \text{(VI)}$$

concorde bien avec le pK calculé par d'autres méthodes ; plus récemment, Michael PEECH (et T. YOUNG), en étudiant des sols à citrus de FLORIDA, a constaté qu'en portant en abscisses le degré de saturation en p. 100 $\left(\frac{S}{T}\right)$ déterminé par déplacement des cations adsorbés à pH = 7) et en ordonnées le pH correspondant aux sols examinés (déterminé en suspension dans l'eau, avec rapport sol : eau 1 : 2 pour les sols minéraux et 1 : 3 pour les sols humifères) on obtient une répartition des pH des sols examinés, en fonction de leur degré de saturation $\left(\frac{S}{T}\right)$ qui correspond à une courbe de titration d'un acide monoprotonique faible AH ayant un pK égal au pK apparent moyen des sols examinés (le pK apparent étant calculé, pour chaque cas particulier, au moyen de la formule (VI)) (10).

Dans les sols étudiés par PEECH et YOUNG le pK apparent moyen a varié de pK apparent = 5,52 en 1937 à pK apparent = 5,41 en 1941-1946.

Mais les pK apparents particuliers des sols d'un même groupe peuvent, pour une même année, varier considérablement, par rapport au pK apparent moyen correspondant.

Ainsi, pour les sols d'une région déterminée, vu la variation dans les cas individuels, par rapport à la valeur moyenne, nous ne pouvons pas, en général, utiliser ce dernier pour calculer, au moyen de la formule (VI) le pH d'un sol de la région, à partir des valeurs de S et T correspondantes.

Par contre, nous pouvons appliquer, pour le calcul du pouvoir tampon des sols, la formule (I) que nous avons déjà proposée pour le cas des vins. En effet, dans cette formule, le pK n'intervient pas.

Dans le cas des sols à complexe incomplètement saturé, la formule (I) devient, en y substituant $(\overline{A})$ par S et (AH) par T-S :

$$R = \frac{dB}{dpH} = 2{,}303 \frac{S(T - S)}{T} \quad \text{(VII)}$$

Dans cette formule, R est le pouvoir tampon du sol en méq/100 g sol. Or, la formule précédente, combinée à la formule :

$$pH = pK + \log \frac{S}{T - S}$$

donne :

$$a)\ R = \frac{dB}{dp\mathrm{H}} = 2{,}303.\ S.\ \frac{1}{1 + 10^{(p\mathrm{H}-p\mathrm{K})}}$$

$$b)\ R = \frac{dB}{dp\mathrm{H}} = 2{,}303\ (T - S) \cdot (1 + 10^{-(p\mathrm{H}-p\mathrm{K})})$$

$$c)\ R = \frac{dB}{dp\mathrm{H}} = 2{,}303.\ T.\ \frac{1}{2 + 10^{(p\mathrm{H}-p\mathrm{K})} + 10^{-(p\mathrm{H}-p\mathrm{K})}}$$

$$d)\ R = \frac{dB}{dp\mathrm{H}} = 2{,}303\ \frac{(S)}{T}.\ S.\ (1 - 10^{-(p\mathrm{H}-p\mathrm{K})})$$

$$e)\ R = \frac{dB}{dp\mathrm{H}} = 2{,}303\ \frac{(S)}{T}.\ T.\ \frac{1}{1 + 10^{(p\mathrm{H}-p\mathrm{K})}}.$$

Dans ces formules $\left(\frac{S}{T}\right)$ représente le degré de saturation du complexe du sol.

De la formule (C) il résulte que, vu que le pK apparent d'un sol d'un groupe de sols donnés, varie, en général, considérablement par rapport au pK apparent moyen du groupe, nous ne pouvons pas, généralement, considérer le pH d'un sol, comme pouvant mesurer aussi son pouvoir tampon.

Plus généralement encore nous ne pouvon pas utiliser les grandeurs pH ou S ou T ou (T — S), figurant dans les formules ci-dessus *a* — *e*, pour évaluer le pouvoir tampon d'un sol d'une région donnée, que si les sols de cette région forment un groupe à pK apparent presque constant (chose qui ne s'observe pas généralement).

Mais les formules *a* — *e* indiquent les facteurs que l'on doit prendre en considération si l'on veut baser sur bases théoriques un procédé d'évaluation du pouvoir tampon d'un sol à partir des valeurs de S ou (T — S) ou T ou $\left(\frac{S}{T}\right)$.

Revenons à la formule (VII) qui, elle, peut toujours servir à l'évaluation du pouvoir tampon d'un sol donné, à complexe incomplètement saturé. En faisant remarquer qu'entre pH = 3 jusqu'à 8, les courbes, donnant B en fonction de pH, sont dans le cas des sols, pratiquement des droites (11), nous pouvons écrire :

$$\frac{dB}{dp\mathrm{H}} = \frac{\Delta B}{\Delta p\mathrm{H}} = \frac{\Delta B}{(p\mathrm{H}) - p\mathrm{H}}$$

ou, en appelant B = X = méq de base forte (par exemple, 1 méq CaO = 0,028 g) par 100 g de sol, pour passer d'un pH inférieur à un pH supérieur (par exemple 6 à 6,5) soit de pH à (pH) :

$$X = 2{,}303\ ((p\mathrm{H}) - p\mathrm{H}) \cdot S\ \frac{(T - S)}{T}$$

et pour la quantité de CaO par hectare (à 4 000 000 de kg de terre par hectare)

$$X = 2{,}303\ ((p\mathrm{H}) - p\mathrm{H}) \cdot S. \frac{(T - S)}{T} \cdot 0{,}028 \cdot 10 \cdot 4\,000\,000 \text{ grammes,}$$

soit : $S = 2579\ ((p\mathrm{H}) - p\mathrm{H})\ S. \frac{(T - S)}{T}$ kilos de CaO

par hectare pour passer de la valeur pH à la valeur supérieure (pH). On obtiendrait des expressions analogues à partir des formules *a* — *e*. Toutes ces expressions concordent bien avec l'expérience des déterminations des besoins des sols en CaO, suivant les méthodes connues. Ainsi, considérons l'expression obtenue à partir de la formule (C). Nous avons :

$$X = 2579\ ((p\mathrm{H}) - p\mathrm{H}) \cdot T. \frac{1}{2 + 10^{(p\mathrm{H}-p\mathrm{K})} + 10^{-(p\mathrm{H}-p\mathrm{K})}}$$

Or T, la capacité d'échange, peut être évaluée approximativement, si l'on connaît le pourcentage d'argile (*a*) et de matière organique (*b*) du sol. En effet (12), en moyenne à 100 g d'argile correspondent 57 méq et à 100 g de matière organique 264 méq. D'où $T = (0{,}57\ a + 2{,}64\ b)$.

Ainsi, la formule ci-dessus devient approximativement :

$$X = 2579\ ((p\mathrm{H}) - p\mathrm{H})\ (0{,}57a + 2{,}64b)\ \frac{1}{2 + 10^{(p\mathrm{H}-p\mathrm{K})} + 10^{-(p\mathrm{H}-p\mathrm{K})}}.$$

De cette dernière relation, il résulte que la quantité de CaO, pour élever le pH d'un sol donné de pH à (pH), dépend de la nature du sol (argileux, humifère, sableux), soit de son taux d'argile et de matières organiques, mais aussi de la force des acides minéraux et organiques du sol (pK), soit de la nature de ses argiles et de sa matière organique (écarts d'avec les coefficients 0,57 et 2,64) et que, de plus, cette quantité est proportionnelle à ((pH) — pH).

Et, en effet, comme exemple, « les doses (de CaO) peuvent être considérées comme sensiblement proportionnelles à l'intervalle de pH à corriger » (13). Ainsi, pour résumer, si dans le cas des sols le pH ne peut généralement pas servir comme mesure de leur pouvoir tampon, par contre la formule (VII) peut être employée pour l'évaluation rationnelle de leur pouvoir tampon et de leurs besoins en chaux. D'ailleurs, l'application de la formule (VII) pose différentes questions à élucider expérimentalement sur lesquelles nous reviendrons.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Roussopoulos (N. C.). — Détermination du pH et du pouvoir tampon de liquides tels que le vin par mesure de l'acidité de titration et de l'alcalinité des cendres. *C. R. Ac. Sc.*, **237**, p. 749-750, 1953.
(2) Genevois (L.) et Ribereau-Gayon (J.). — Le Vin, Hermann et Cie, Paris, p. 17, 1947.

(3) Genevois (L.) et Ribereau-Gayon (J.). — Le Vin, Hermann et Cie, Paris, p. 19, 1947.
(4) Demolon (A.). — Dynamique du sol, 5e édition, Dunod, Paris, pp. 131 et 149, 1952.
Scheffer (F.). — P. Schachtschabel, Lehrbuch der Agrikulturchemie, I, Bodenkunde Enke, Stuttgart, p. 131, 1952.
(5) Scheffer (F.). — P. Schachtschabel, *loc. cit.*, p. 90.
(6) Scheffer (F.). — P. Schachtschabel, *loc. cit.*, p. 137.
(7) Scheffer (F.). — P. Schachtschabel, *loc. cit.*, p. 92.
(8) Scheffer (F.). — P. Schachtschabel, *loc. cit.*, p. 130.
(9) Bradfield (R.). — Some chemical reactions of colloidal clay. *Journ. Phys. Chem.*, **35**, p. 360-373, 1931.
(10) Peech (M.). — Revised by T. W. Young, Chemical Studies on Soils from Florida Citrus Groves, Agricultural experiment Station, Gainesuille, Florida, Bulletin 448, p. 18-20, sept. 1948.
(11) Demolon (A.). — *Loc. cit.*, p. 373.
(12) Demolon (A.). — *Loc. cit.*, p. 370.
(13) Demolon (A.). — *Loc. cit.*, p. 375.

DÉTERMINATION QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES MEMBRANES INTERNES DU GRAIN DE BLÉ

Role dans les industries des céréales

Par

R. GEOFFROY

Laboratoire d'Études et de Contrôle de la qualité des Blés français, Paris

---

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Introduction.
II. — Propriétés chimiques générales des membranes et recherches préliminaires.
III. — Matières premières utilisées.
IV. — Mode opératoire.
V. — Résultats :
a) Composition des membranes.
b) Caractérisation et localisation des pentosanes.
c) Étude des hémicelluloses.
VI. — Importance des membranes dans la technologie meunière.
VII. — Influence des membranes sur la valeur boulangère.
VIII. — Conclusions.
IX. — Bibliographie.

I. — INTRODUCTION

L'endosperme du grain de blé est formé de cellules à parois minces, contenant un réseau de matières protéiques, dans lesquelles les grains d'amidon sont enchâssés.

Aimé Girard les a signalées le premier (1) ; ces cellules, de forme allongée, mesurent 200 à 300 μ dans leur longueur contre 100 μ dans leur largeur.

Mademoiselle Crewe (2) donne sensiblement les mêmes dimensions des cellules de blé Manitoba ; les dimensions et la forme de celles-ci diffèrent suivant l'emplacement qu'elles occupent dans le grain ; près du sillon et dans la zone dorsale, les cellules sont en forme d'aiguille de di-

mensions de 200-50 μ, tandis que dans les centres des côtés du grain, ce sont de larges cellules polygonales de 140-100 μ environ.

L'épaisseur des membranes, délimitant ces cellules, déterminée récemment (3), varie de 2,6 μ du centre du grain à 7,3 μ près du sillon.

Si, comme on vient de le voir, les dimensions des membranes cellulaires sont bien connues, il en est autrement de leur importance quantitative. Jusqu'ici, aucune détermination pondérale n'avait été tentée ; quant aux recherches qualitatives, elles sont bien décevantes, comme on va pouvoir en juger.

Tout d'abord, on peut citer le mémoire de CLAISON et SCHRYVER (4) : ceux-ci dosent globalement les hémicelluloses, après divers traitements pour éliminer les constituants autres de la farine, le résidu est extrait par la soude à 4 p. 100 ; ces auteurs isolent 5,4 p. 100 d'une cellulosane composée de glucose.

Il n'existe à notre connaissance qu'un autre travail sur cette question: il s'agit du mémoire de WOLF, SECKINGER, ROSEWALL, MASTER et RIST (5), paru en 1953. Les cellules de l'endosperme, débarrassées de l'amidon, des pentosanes solubles dans l'eau, sont hydrolysées par l'acide sulfurique à 2 p. 100 et la solution obtenue est étudiée par chromatographie ; d'après ces auteurs, les cellules sont composées de 27 à 55 p. 100 d'hémicelluloses comprenant à peu près moitié de xylose et moitié d'arabinose, avec un peu de galactose. Ce travail a été effectué sur des coupes de grain de 1 à 2 mg.

Les conclusions de ces deux mémoires, différentes quant aux résultats, sont nettement insuffisantes pour déterminer les constituants des membranes.

La farine de froment étant le produit quasi-intégral de la mouture de l'endosperme, il nous a semblé utile de déterminer l'importance quantitative et qualitative de ces membranes de cellules ; ceci fait, nous avons étudié leur rôle et leur importance dans la technique meunière, puis leur influence sur la valeur boulangère des farines.

Nous avons repris l'étude de cette question en éliminant d'avance les micro-méthodes, car il nous fallait suffisamment de membranes pour rechercher leurs actions sur les propriétés boulangères.

II. — PROPRIÉTÉS CHIMIQUES GÉNÉRALES DES MEMBRANES ET RECHERCHES PRÉLIMINAIRES

Les membranes végétales se composent ordinairement de cellulose, d'hémicelluloses, de pentosanes et de matières pectiques ; la lignine est la seule substance importante de nature non glucidique.

Les constituants des membranes sont des polysaccharides de poids moléculaire élevé ; l'absence de critère de pureté accroît beaucoup les

difficultés de leur étude. Leurs propriétés chimiques sont caractérisées parune résistance notable aux réactifs, par leur insolubilité dans l'eau et dans presque tous les solvants ; ceci explique les difficultés de leur isolement, de leur étude, et de leur dosage.

Dans le cas de l'albumen du blé, il aurait suffi de doser en bloc cellulose, hémicelluloses, pentosanes, acide pectique et lignine pour connaître le poids des membranes, mais, comme nous l'avons vérifié, il n'y a pas de lignine et l'absence d'acides uroniques et de pectine semble certaine.

Notre dosage s'est trouvé heureusement simplifié au départ et se réduit à celui de la cellulose, des hémicelluloses et des pentosanes.

Après quelques recherches préliminaires, nous avons pu déterminer la passivité des hémicelluloses vis-à-vis des enzymes usuels et certaines de leurs propriétés qui permettent leur séparation : solubilité dans les alcalis dilués pour les hémicelluloses proprement dites et possibilité de dissolution dans l'eau pour les pentosanes.

Ceci posé, il nous était facile de faire choix d'une méthode d'étude et de dosage des membranes cellulaires.

Au départ, nous avons essayé la méthode de WILLIAMS et OLMSTED, exposée par FOURNIER dans son important travail de thèse (6). Celle-ci consiste, après autoclavage et digestion pancréatique préalable, à traiter le résidu par l'acide sulfurique à 60 p. 100 en volume à froid, puis à l'ébullition en solution diluée 15 fois. Après neutralisation, les hexoses sont dosés avant et après fermentation en se basant sur les propriétés réductrices des solutions et les pentoses résiduels de fermentation sont calculés à partir des dosages de furfural.

A l'examen des résultats obtenus, et après quelques modifications pour l'adapter aux produits de mouture, la méthode nous a semblé satisfaisante pour isoler les membranes cellulaires des céréales.

Inspiré du mémoire de FOURNIER (6), le travail d'isolement est le suivant : délipidation rapide du produit par l'éther à froid, puis, après gélification de l'amidon, action de la pancréatine dans des conditions déterminées.

La centrifugation ou la filtration sur un tissu spécial très fermé permet l'isolement des membranes dans un état de pureté satisfaisant pour leur étude ultérieure.

Dans les conditions déterminées ci-après, la pancréatine solubilise l'amidon et les protéines qui forment 94 p. 100 environ de la matière sèche de l'albumen du grain de blé, il reste entre les mains de l'opérateur un résidu constitué par la partie insoluble des membranes.

III. — MATIÈRES PREMIÈRES EMPLOYÉES

Notre étude se bornant, pour l'instant, à l'étude de l'albumen du grain de blé, il est nécessaire d'utiliser une matière première représentant aussi bien que possible celui-ci ; les moyennes semoules blanches, peu riches en matières minérales et pratiquement exemptes de fragments de germes et de son, conviennent pour ce genre d'étude.

La farine est à rejeter, car, dans la mouture, les membranes les plus résistantes sont éliminées, tandis que les plus friables sont pulvérisées avec l'amande. Nous avons eu à notre disposition des semoules provenant de la mouture de blé Français et de blés durs Nord-Africains.

La méthode d'isolement et de dosage étant au point, nous avons suivi les transformations des membranes dans la mouture en les dosant dans différents produits du diagramme.

IV. — MODE OPÉRATOIRE

Le mode opératoire est le suivant : 200 g de semoules sont délayés dans 1 litre d'eau ; en agitant, on porte à l'aide d'un bain d'eau chaude, à 90°C ; on opère lentement à partir de 60°C pour effectuer une saccharification partielle par les diastases de la farine ; pour la faciliter, il est recommandable d'ajouter un gramme d'amylase du malt en solution vers 65° environ. On marque un temps d'arrêt à cette température, puis on porte à 90° et à l'ébullition ; on laisse refroidir à 48°, il faut que la masse soit assez fluide autrement l'action de la pancréatine est incomplète ; c'est pourquoi, il est nécessaire d'effectuer un commencement de saccharification par la diastase de la farine, enrichie par un peu d'amylase si les semoules en sont pauvres.

A la masse refroidie, on ajoute 20 cc de phosphate trisodique et on ajuste le pH à 8, avec HCl N.

On met en suspension 10 g de pancréatine codex dans 50 cc d'eau salée à 8 p. 100 et on l'ajoute à l'empois en remuant bien. On porte à l'étuve à 40° et on laisse l'hydrolyse s'effectuer pendant deux jours sous toluène ; la saccharification est, en général, à peu près terminée ; il reste un peu d'amidon inaltéré et des dextrines.

On centrifuge et remet en suspension dans 400 cc d'eau à pH 8 comme ci-dessus : on ajoute 10 g de pancréatine dans l'eau salée et on laisse à l'étuve sous toluène une journée ou deux. Si on a opéré correctement, on obtient une solution peu visqueuse et ne colorant plus en bleu à l'iode. On centrifuge, lave au moins deux fois à l'eau distillée, puis à l'alcool le culot de centrifugation. On sèche sous vide, pèse le résidu, et on le broie de façon à le transformer en poudre.

Le liquide centrifugé est recueilli à part ; on porte à l'ébullition, filtre et ensemence avec 10 g de levure de boulangerie, après refroidissement à 35-40° et à pH 5 environ ; on laisse la fermentation s'effectuer pendant une demi-journée. On concentre sous vide et précipite par l'alcool de façon à avoir 65-70° de titre. Il faut recommencer plusieurs fois l'opération pour éliminer les dextrines ; on peut opérer différemment, par précipitation par le sulfate d'ammoniaque à saturation ; enfin on dyalise et précipite par l'alcool. Le précipité est séché sous vide et réduit en poudre.

Si l'on n'a en vue que l'isolement de membranes, on peut opérer de la façon suivante : on lixivie sous un filet d'eau 200 g de semoules (comme pour une extraction de gluten). On recueille les eaux de lavage sur un tamis très ouvert, puis à la fin de l'opération, on les tamise sur un tamis plus fermé, garni avec du 90 environ.

Le refus du tamis est traité par la pancréatine ; l'avantage du procédé est d'éliminer au départ les protéines et la plus grande partie de l'amidon, mais il n'est pas quantitatif.

V. — RÉSULTATS

a) Composition des membranes

Les résidus de digestion, séchés sous vide après lavage, se présentent sous l'aspect d'un produit corné répondant à l'analyse moyenne suivante : humidité 10 p. 100, matières azotées 10 p. 100, matières minérales 5,6 p. 100 ; l'hydrolyse effectuée, soit à l'ébullition pendant trois heures, soit au bain-marie pendant quatre heures, en présence de 2 p. 100 d'acide sulfurique, libère 70 à 75 p. 100 de sucres, comptés en glucose.

Le pouvoir rotatoire des solutions obtenues est de + 46° environ.

La détermination des pentosanes se fait après fermentation, selon FOURNIER (6), par dosage du réducteur infermentescible. Cette valeur est vérifiée par transformation des pentoses en furfural. Le pouvoir rotatoire de la solution fermentée, après défécation voisine, 52°. Tous les glucides ont été caractérisés par leurs osazones, forme cristalline, solubilité dans les solvants et points de fusion de celles-ci.

On isole 0,4 p. 100 de pentosanes dans la partie soluble, après la première action de la pancréatine, et 0,3 p. 100 dans la deuxième hydrolyse. Ces chiffres ne représentent que des valeurs indicatives, légèrement variables avec le produit étudié et surtout avec les conditions de traitement qui ne sont jamais absolument identiques. Il n'existe pas de pectine en quantité appréciable et, 0,1 p. 100 au plus, de cellulose déterminée selon BERTRAND (7).

En résumé, pour 100 g de semoulettes, nous obtenons 5 g de produits insolubles ; parmi ceux-ci, 77 p. 100 sont des constituants spécifiques des membranes dont 0,1 p. 100 de cellulose, 2,25 p. 100 de cellulosanes et 1,5 p. 100 de pentosanes.

Il reste en propre aux parois des cellules 3,85 p. 100, auxquels il faut ajouter les pentosanes solubles, soit 0,6 p. 100 (nous justifierons plus loin cette opération). 4,45 p. 100 est donc la quantité minimum des membranes existant dans l'albumen du grain de blé.

En réalité, on peut faire rentrer dans cette valeur une partie des matières azotées qui les accompagnent et, finalement, on peut arrondir à 5 p. 100.

Ces valeurs sont des moyennes de plusieurs analyses et sont valables pour des semoulettes de blés français, récolte 1953.

b) Caractérisation et localisation des pentosanes

Les pentosanes ont l'aspect d'une substance cornée blanche soluble dans l'eau ; il faut insister pour que la masse gonflée se dissolve dans l'eau chaude ; elles sont insolubles dans l'alcool à 65° ; c'est cette propriété qui est la plus commode pour la purification et pour les débarrasser des matières azotées qui les accompagnent. Elles sont infermentescibles et ne paraissent pas touchées par les différentes diastases que nous avons utilisées.

Les pentosanes entrent partiellement en solution dans l'eau quand on traite les semoulettes ou la farine par ce solvant ; on les rencontre donc dans les extraits pancréatiques. On peut les isoler des résidus de membranes, réduits en poudre, par un grand volume d'eau chaude au bain-marie, pendant quelques heures ; il passe en solution, en même temps, un peu de glucosane (décelable par la coloration bleue à l'iode) et des matières azotées. On concentre l'extrait aqueux sous vide ; on garde quelques jours sous toluène, les traces de glucosane et une partie des matières azotées précipitent ; on filtre et précipite les gommes par l'alcool, le titre final ne doit pas dépasser 65°. On peut les purifier par une nouvelle dissolution aqueuse et précipitation par l'alcool.

Les propriétés des pentosanes sont sensiblement les mêmes quelles que soient leurs origines, extraction aqueuse directe, ou après stérilisation par l'alcool des semoules, extraction des résidus de membrane, comme il résulte de l'examen du tableau I. Enfin, les pentoses résiduels, après l'action de la levure sur les glucides des membranes hydrolysées sont les mêmes que ceux des pentosanes isolées ailleurs ; le pouvoir rotatoire varie, en moyenne entre 50° et 55°.

Les pentosanes proviennent donc exclusivement des membranes cellulaires et ne semblent pas exister dans la farine (8).

TABLEAU I

Nature des pentosanes	P. R avant α_0	P. R. après hydrolyse α_T
1. Extraction directe aqueuse	— 120	+ 50
2. Extractions après stérilisation par l'alcool d'un kilo de semoule :		
1° première ext. 9 g	— 114	+ 43
2° deuxième ext. 3 g		
3° troisième ext. 1,5 g.....	— 96	+ 54
3. Extraction aqueuse des résidus de membrane....	— 100	+ 55
4. Isolée du traitement à la pancréatine.....	— 95	+ 53
5. Extraction aqueuse d'une farine de fin de mouture	— 96	+ 60

En conclusion des examens des dosages de réducteurs, des pouvoirs rotatoires trouvés, des caractérisations des osazones, nous pouvons affirmer que les pentosanes hydrolysées sont composées d'un mélange à peu près égal d'arabinose et de xylose avec, en plus des traces de galactose.

c) **Etude des hémicelluloses**

Étant donné leur passivité devant les réactifs habituels, les glucosanes, ou hexosanes, ou hémicelluloses se rapprochent de la cellulose ; inattaquables par les diastases du malt et la pancréatine, elles fournissent avec l'eau iodée une magnifique coloration bleue ; insolubles dans l'eau froide, très peu solubles dans l'eau chaude, les solutions alcalines à 4 p. 100 les dissolvent, d'où on peut les précipiter par acidification. Le pouvoir rotatoire déterminé dans la soude à 4 p. 100 est de + 110° ; après hydrolyse, le pouvoir rotatoire s'abaisse à 55° ; les glucides sont composés presque uniquement de glucose, avec des traces de xylose et d'arabinose que nous considérons jusqu'à nouvel ordre comme impuretés. L'hydrolyse demande au moins 5 heures au bain-marie bouillant, en présence de 2 p. 100 d'acide sulfurique concentré.

La pureté des glucosanes dépend du genre d'extraction employé ; avec la diastase du malt de titre 100, nous n'avons jamais pu obtenir de glucosane à moins de 50 p. 100 de matières azotées. L'effet protéolytique de cet enzyme est, en effet, très inférieur à celui de la pancréatine.

L'extraction classique des hémicelluloses avec la soude à 4 p. 100 sur les résidus de membrane, préparés à l'aide de la pancréatine fournit des résultats assez réguliers ; dans le cas le plus favorable, on obtient à partir de 200 g de semoulettes de 2 à 6 g de produit, contenant toujours une certaine quantité de protéines que l'on peut enlever partiellement par l'alcool à 70° chaud. Le bilan en produit à 90 p. 100 de glucose ne dépasse pas 1 p. 100 en hemicelluloses purifiées. Il est facile de constater

que, malgré sa faible solubilité dans l'eau froide, on laisse des glucosanes dans les liquides d'extraction, que l'on décèle facilement grâce à la coloration bleue qu'elles donnent avec l'eau iodée.

L'eau chaude les dissout faiblement, et elles restent facilement en sursaturation sous forme de liquide opalescent. Il est préférable d'extraire par l'eau bouillante les pentosanes des résidus de membranes de façon à obtenir directement un produit purifié pour l'extraction des hémicelluloses, par le traitement alcalin. Toutefois le résidu contient encore des pentosanes, il semble impossible de les extraire tellement elles paraissent liées aux glucosanes et aux matières azotées.

De même le résidu d'extraction des glucosanes par la soude à 4 p. 100 contient encore des glucosanes, des pentosanes et des matières azotées qui semblent liées entre elles, ayant résisté aux multiples traitements nécessités pour leur isolement.

Ces résultats nous conduisent à regarder la paroi cellulaire comme une armature de cellulose en longs filaments, imprégnés de cellulosane, de pentosanes et de matières azotées. Par suite de la facilité d'extraction des pentosanes par l'eau, celles-ci paraissent localisées principalement sur les faces externes des parois des membranes.

VI. — IMPORTANCE DES MEMBRANES DANS LA TECHNIQUE MEUNIÈRE

Nous avons examiné d'autres produits de mouture que les semoulettes. Dans tous les cas, il faut opérer sur des échantillons exempts de débris de son ou de germe ; la présence de ceux-ci, en raison de leur grande richesse en hémicelluloses, fausserait les résultats.

TABLEAU II

Nature du produit	Poids brut pour 100 g de produits	Matières azotées %	Matières min. %	Humidité	Sucres totaux en glucose %	Pentoses %
Semoulettes de blé français	5	10	5	10	72-75 %	30
Semoulettes de blés durs algériens	3	9	4	8	72	30
Refus blanc du C_1 au C_6	6,5	12	3	3	85	34
Farine C_1 :						
refus au 180	3,6	9	5	6	60	20
extraction	2,5	12	7	7	30	6
Farine de fin convertissage	7	14	6	7	70	34

Nous avons analysé de la même façon des semoulettes de blé dur algérien ; elles se sont montrées moins riches que les semoulettes de blé français.

Dans le tableau II sont présentés des résultats relatifs à une farine C_1

très pure, les hémicelluloses ont été déterminées dans la partie ronde, refus du 180 et dans la partie fine extraite. La partie ronde est nettement plus riche en membranes ; cela résulte de la forme en feuillet des parois de membrane, solidement soudés à l'albumen amylacé par les protéines, grâce à quoi ces lamelles farineuses résistent assez facilement à la pression différentielle des cylindres lisses, sans grand dommage.

De plus, l'ouverture des mailles des tamis, garnis de soie de 8, soit 180 μ d'écartement, laisse passer des cellules intactes et même des assemblages plus ou moins dilacérés de cellules avec leurs membranes.

Les refus blancs des bluteries des premiers convertisseurs contiennent plus de membranes que les farines d'extraction pour la même raison (refus blanc du C_1 au C_6).

On constate que les farines de fin de convertissage sont riches en hémicelluloses par suite d'un enrichissement en celles-ci de l'alimentation des derniers passages et d'une pulvérisation partielle des membranes sur ces cylindres très serrés. Ces triturations énergiques sur les cylindres lisses arrivent à en pulvériser une partie qui réussit à passer avec la farine, au travers des garnitures d'un blutage garni de soie 13 à 14 XX, donc à mailles d'ouverture de 90 μ seulement. Il y a plus de 7 p. 100 de parois de cellules, dans les fins de convertissage, soit plus du double que dans les farines ordinaires que nous avons examinées.

La distribution des membranes dans le circuit de la mouture est simple : des différentes semoules, séparées au broyage, purifiées au sassage, converties, les parties les plus résistantes des membranes passent des refus des plansichters sur les derniers convertisseurs, puis dans les remoulages.

Après chaque convertissage une fraction reste avec les parties rondes de la farine extraite, une certaine quantité est pulvérisée avec la farine, mais les parties les plus résistantes vont dans les refus et sont acheminées après les convertissages énergiques de fin de mouture, mélangés aux débris d'enveloppes et de germes, dans les remoulages blancs.

En somme, les membranes cellulaires se comportent comme un « son interne » blanc, qui, comme lui, est rejeté en fin de mouture, dans les remoulages grâce à ses propriétés élastiques et à sa forme lamellaire.

VII. — INFLUENCE DES MEMBRANES SUR LA VALEUR BOULANGÈRE DES FARINES

Nous avons pu isoler suffisamment de pentosanes et de glucosanes pour étudier leur influence sur la valeur boulangère des farines, à l'aide de l'alvéographe.

Les glucosanes et les pentosanes ajoutées, sèches ou gonflées dans l'eau de pétrissage des farines, aux doses de quelques p. 100, changent

l'allure des courbes obtenues à l'alvéographe : la ténacité augmente considérablement au détriment du gonflement. Voici, par exemple, les résultats obtenus avec une farine française :

	P	G	W
Farine témoin	39	21,5	96
additionnée de 1 % de pentosanes ...	60	19	113
» 2 % de glucosanes.....	106	14	158

Cela n'a rien d'étonnant, étant connu le pouvoir de gonflement des hémicelluloses et des pentosanes dans l'eau ; celles-ci retiennent à leur profit une partie de l'eau des pâtes, au détriment de leur élasticité.

Il y a aussi une augmentation de la viscosité du milieu due aux propriétés physiques spéciales des hémicelluloses et des pentosanes, composées de macromolécules très ramifiées.

VIII. — CONCLUSIONS

Il est heureux que la majeure partie des parois cellulaires soit éliminée sous forme de son interne, pellicule blanchâtre, riche encore en amidon et en protéines, dans les remoulages ; mais une partie est pulvérisée finement et passe au travers du tissu blutant avec la farine. Ces membranes sont en particulier facilement localisables dans les farines de queue de mouture qui en contiennent le plus et, ce sont elles, qui en abaissent la valeur boulangère.

Dépourvues de toute élasticité, les membranes cellulaires donnent aux pâtes le caractère de gras et de collant particulier des farines de fin de mouture. Après l'enfournement, au moment de la cuisson, le pain se développe peu par suite de l'absence de caractère plastique des parois cellulaires.

Toutes ces propriétés abaissent d'une façon marquée les propriétés boulangères des farines qui en sont riches, comme les fins de convertissage qui représentent environ 15 p. 100 de la farine totale.

Il est presque superflu d'ajouter que ces membranes sont indigestibles, fonctionnent comme ballast dans l'intestin, et ne servent qu'à hydrater le pain. Que ce soit du point de vue valeur boulangère des farines, ou considérées sous l'aspect nutritionnel, ces membranes de cellule sont à rejeter du circuit alimentaire et doivent être dirigées, vers les issues de moulin, dans les aliments du bétail.

Jusqu'alors on considérait que le grain de froment se composait en moyenne de 15 p. 100 d'enveloppes, de 2,5 p. 100 de germe et scutellum, le restant étant l'albumen farineux pour 82,5 p. 100. Maintenant, il nous faut réviser ces proportions en diminuant la part de l'amande de 5 p. 100, représentée par les membranes de cellules.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) GIRARD (Aimé). — Le Froment et sa mouture (Gauthier Villars, Ed. Paris), p. 69, 1903.
(2) CREWE (J.). — D'après le Bulletin des anciens élèves de l'École de Meunerie, n° 126, p. 204, 1951.
(3) LARKIN (A.), MAC MASTER et RIST (E.). — Relation entre l'épaisseur des cellules des membranes avec les propriétés meunières de certains blés. *Cer. Chem.*, **29**, n° 5, p. 407, 1953.
(4) CLAISON et SCHRYNER. — *Biochem. J.*, **17**, p. 496, 1923.
(5) WOLF (J.), SECKINGER (L.), ROSEWALL, MAC MASTERS et RIST (E.). — Étude des hemicelluloses des parois internes en relation avec les propriétés meunières. *Cer. Chem.*, **29**, n° 5, p. 399, 1953.
(6) FOURNIER (F.). — Les méthodes de dosage des constituants des membranes végétales. *Bull. de la Sté Scient. d'Hyg. Alim.*, **36**, n° 4-5-6, p. 122, 1948, et les constituants des membranes végétales dans leurs rapports avec les phénomènes digestifs. *Th. Sc. Nat.*, Série A 2242, n° 3113, Paris 1948.
(7) BERTRAND (G.). — *Ann, Agr.*, **7**, 1, 1937.
(8) GEOFFROY (R.). — Le Blé, la Farine, le Pain (Dunod Ed. Paris), p. 10, 1950.

LES PROTIDES DES CÉRÉALES

PAR

A. BOURDET

Laboratoire de Biochimie et de Physico-Chimie
des Céréales et de leurs dérivés, Paris

PREMIÈRE PARTIE

LE BLÉ

I. — **Teneur en protides.**
   1. — Grain, farines et produits de mouture.
   2. — Influence du milieu.
   3. — Répartition dans le grain.
   4. — Méthodes de dosage.

II. — **Les protéines du blé.**
   Le gluten.
   Les protéines constituantes du grain de blé.
      A) *Etude qualitative.*
         1. — Fractionnement et isolement selon OSBORNE.
         2. — Caractères de solubilité ; facteurs qui les modifient.
         3. — Dispersion des protéines du gluten par les acides et les alcalis.
         4. — Inconvénients de la méthode de fractionnement selon OSBORNE.
         5. — Dispersion des protéines par les solvants neutres.
      B) *Etude quantitative.*
         1. — Composition du blé en protéines « solubles » et « insolubles ».
         2. — Facteurs modifiant la composition en protéines.

III. — **Propriétés physico-chimiques.**
   A) Protéines du « non gluten » et protéines du gluten.
      1. — Albumines-globulines } point isoélectrique
      2. — Gliadine-gluténine } poids et structure moléculaires.
   B) Le Gluten.
      1. — Propriétés colloïdales, gonflement, viscosité.
      2. — Structure.
   C) Dénaturation des protéines du blé.
   D) Homogénéité ou hétérogénéité des protéines.
      1. — Protéines « solubles » } comportement à l'ultracentrifu-
      2. — Protéines « insolubles » } gation et à l'électrophorèse.
      3. — Le gluten.

IV. — **Les acides aminés du blé.**
Méthodes d'analyse.
1. — Acides aminés du grain de blé et de ses constituants.
2. — Acides aminés et peptides libres du blé de la farine et du germe.
3. — Acides aminés constituants des protéines.
4. — Influence des facteurs génétiques, agronomiques et technologiques sur la composition en acides aminés.

V. — **Valeur nutritive des protides du blé.**
1. — Acides aminés limitants.
2. — Valeur nutritive des constituants du grain.
3. — Amélioration de la valeur nutritive.
4. — Facteurs amoindrissant la valeur nutritive.

VI. — **Les protides des blés et des farines et la valeur boulangère.**
A) Gluten et valeur boulangère.
1. — Rôle de sa composition en protéines.
2. — Rôle de sa composition en acides aminés.
3. — Rôle de ses propriétés physiques et mécaniques.
4. — Action des réducteurs et des oxydants sur les protéines de la pâte.
B) Protéines « solubles » et valeur boulangère.

VII. — **Autres protides constituants du blé.**

INTRODUCTION

Soumise à des influences diverses, dont les plus importantes relèvent des facteurs variétaux et du milieu extérieur où se développe la plante, la teneur en protides des graines de céréales est extrêmement variable. Elle est déterminée en multipliant la teneur en azote total donnée par l'analyse par un coefficient, variable selon la céréale, établi en fonction de la teneur en azote de ses protéines constituantes. Nous avons groupé dans un tableau, parallèlement au coefficient de transformation respectif, les teneurs moyennes en protides des grains des diverses céréales qui feront l'objet de cette étude, ainsi que des farines correspondantes, de pureté comparable à celle des farines de froment panifiables extraites à 75 p. 100.

Composition moyenne des grains des céréales en protides (en p. 100 de substance sèche).

	Blé	Orge	Seigle	Avoine	Riz	Maïs
Grains.....	12-14	10,5	10	12	7,5	10
Farines.....	9-13	10	7	11	7,8	7
Coefficient	5,7	5,7	5,7	5,7	6,25	6,25

On trouve dans le matériel azoté des grains des céréales, tous les groupes de constituants protidiques définis par les biochimistes :
— en quantités mineures :

amides, acides aminés et *peptides,* à l'état libre.

hétéroprotéines (nucléoprotéines) localisées essentiellement dans le germe ;

— en quantités beaucoup plus importantes des *holoprotéines* représentant un pourcentage très élevé des protides totaux du grain. Importantes en quantité les holoprotéines le sont aussi en qualité et ce sont elles qui constitueront l'essentiel de l'étude qui va suivre.

C'est l'œuvre considérable d'Osborne et de ses élèves qui a permis de dégager les notions fondamentales sur la constitution des protéines végétales en général et des protéines des céréales en particulier.

On rencontre chez les végétaux 4 groupes distincts d'holoprotéines tels qu'ils ont été définis par leurs caractères de solubilité ; mais de ces 4 groupes, 2 seulement, les *glutélines* et les *prolamines* sont vraiment spécifiques des céréales. Si les grains des céréales renferment en quantités appréciables des *albumines* et des *globulines,* types protéiques présents également dans le règne animal, leur présence se trouve masquée, du moins dans l'endosperme, par celle de ces protéines moins solubles que sont *prolamines* et *glutélines*.

Il serait peut-être encore plus exact de dire que les glutélines sont les protéines type des céréales, du fait qu'elles sont présentes de façon constante, alors que les prolamines solubles dans l'alcool sont présentes à l'état de traces seulement chez certaines céréales telles que le riz.

Dans l'endosperme des grains mûrs, les protéines forment un réseau dans lequel sont enchassés les granules d'amidon. Au cours du développement de la plante ces protéines constituent le matériel azoté fondamental du protoplasme cellulaire et se trouvent à l'état de dispersions colloïdales mobiles. Lorsque s'effectue le mûrissement, les protéines voient leurs propriétés totalement modifiées : elles perdent, en particulier, cette propriété d'être solubles dans l'eau ou les solutions salines qui constituent le milieu dispersant de la cellule végétale vivante. Elles acquièrent en retour des propriétés physiques et mécaniques variables selon la céréale, propriétés atteignant une qualité exceptionnelle dans le cas du blé, justifiant ainsi l'utilisation de cette céréale dans de nombreuses préparations alimentaires dont le pain ne constitue pas la moindre.

Classées selon leur importance quantitative dans le grain, les holoprotéines rencontrées chez les céréales sont les suivantes :

1. *Glutélines* : présentes chez toutes les céréales ; constituent avec les gliadines, le complexe protéique appelé « gluten », d'une importance primordiale dans le cas du blé.

2. *Prolamines* : diffèrent considérablement d'une céréale à l'autre ; lorsqu'elles sont présentes, sont étroitement associées aux glutélines desquelles elles peuvent être séparées par extraction à l'alcool dilué.

3. *Albumines* : constituent les protéines en quantités mineures de l'endosperme et vraisemblablement le matériel protéique original du protoplasme. En raison de leur grande solubilité elles jouent le rôle de colloïdes protecteurs dans le protoplasme vivant et même dans le germe ou l'embryon à l'état de vie ralentie, et présentent de ce fait une extrême importance.

4. *Globulines* : constituent les protéines prédominantes des graines de nombreuses plantes comestibles, mais sont présentes en quantités relativement faibles dans l'endosperme des céréales. Elles semblent être plus abondantes dans le son et le germe.

Nous avons rassemblé sous forme de tableau, la composition quantitative en protéines des grains des diverses céréales faisant l'objet de cette étude, telle qu'elle avait été déterminée par Osborne.

Composition en protéines des grains des céréales (selon Osborne 1895-1910) (en protéine p. 100 des grains).

	Blé	Orge	Avoine	Seigle	Riz	Maïs
Albumine.....	0,4 (leucosine)	0,3 (leucosine)	—	0,43 (leucosine)	1,6 à 3,2	—
Globuline.....	0,6 (édestine)	1,95 (édestine)	1,5 (avénaline)	1,76 (édestine)	0,5	0,4
Prolamine	4,5 (gliadine)	4 (hordéine)	1,25 (gliadine)	4 (gliadine)	0,5	5 (zéine)
Glutéline	4 (gluténine)	4,5	9,05 (avenine)	2,44	1,2 à 2 (oryzénine)	3,5

— Les méthodes de fractionnement et d'isolement des protéines des céréales préconisées par Osborne faisaient intervenir divers solvants à action dénaturante plus ou moins marquée. Les efforts des chercheurs se sont alors orientés vers la découverte de solvants non dénaturants, susceptibles de solubiliser la majorité, sinon la totalité des protéines. A partir des dispersions ainsi obtenues, la précipitation fractionnée devenait possible.

— L'étude des propriétés physiques et physicochimiques des fractions protéiques ainsi obtenues a pu être poussée grâce aux techniques modernes d'analyse : ultra-centrifugation, électrophorèse, chromatographie, diagrammes de rayons X. Tout récemment le principe de l'électrophorèse a pu être étendu à des séparations de protéines sur papier-filtre. Il a été ainsi possible d'acquérir des renseignements plus précis concernant le poids, la forme, la charge électrique et la structure des molécules protéiques.

Dans la plupart des cas, les méthodes mises en œuvre ont démontré l'hétérogénéité des fractions protéiques considérées initialement comme homogènes.

— Nos connaissances sur la composition des protéines en acides aminés ont fait également de grands progrès grâce aux méthodes biologiques et physicochimiques modernes. Le dosage microbiologique des acides aminés a constitué une importante étape dans la précision des résultats. Mais le plus grand pas a été fait il y a quelques années lorsque les biochimistes eurent à leur disposition les méthodes chromatographiques permettant de séparer de façon rapide et individuellement les acides aminés d'un hydrolysat protéique. La chromatographie de partage sur papier, méthode la plus fréquemment utilisée, a permis l'identification de certains acides aminés non décelés par les méthodes classiques tel que l'acide γ aminobutyrique de l'orge et de certaines autres céréales. Des services identiques ont été rendus par les techniques de fractionnement sur résines échangeuses d'ions.

— Enfin, les résultats concernant la composition en acides aminés des diverses céréales et des produits alimentaires qui en dérivent mettent en évidence leur faible teneur en deux acides aminés indispensables : tryptophane et lysine. La déficience azotée des aliments à base de céréales devra donc être compensée par un apport complémentaire de protéines végétales (soja) ou animales, plus riches en acides aminés.

Parmi les innombrables travaux dont les céréales ont été l'objet, le blé occupe incontestablement la première place. Aussi l'étude qui va suivre s'adressera d'abord au blé ; elle sera suivie par celle des céréales secondaires : orge, seigle, avoine, riz, maïs.

PREMIÈRE PARTIE

LE BLÉ

I. — TENEUR EN PROTIDES

1. — Grain, farines et produits de mouture

Comprise entre les valeurs extrêmes de 7 et 24 p. 100 la teneur moyenne du grain de blé en protides peut être estimée à 12 p. 100.

La richesse du grain en matières azotées est dans une certaine mesure un caractère variétal, ainsi que l'indiquent les valeurs rapportées ci-dessous concernant diverses variétés de blés tendres (Triticum vulgare).

Blés farineux (type Soft Red Winter) :

8 à 12 p. 100 : moyenne 10,5 p. 100 ; farine de 7 à 10 p. 100 : moyenne 9 p. 100 environ.

Certaines farines destinées à la biscuiterie peuvent avoir des teneurs plus faibles, 7,5 à 8,5 p. 100.

Blés vitreux (type Hard Red Spring — Hard Red Winter) :

11 à 16 p. 100 : moyenne 12 à 13 p. 100 ; farine 10,8 p. 100 environ.

Quant aux *blés durs* (Triticum durum), ils contiennent de 11 à 18 p. 100 et fournissent les semoules et les autres produits de mouture entrant dans la fabrication des pâtes alimentaires.

La teneur en protides totaux d'un blé ou d'une farine s'obtient en multipliant par le coefficient 5,7 sa teneur en azote total.

Quant aux produits de mouture du grain, leurs teneurs moyennes en protides sont les suivantes : son 15 à 17, semoules 16 à 17, germe 35 à 40.

2. — Influence du milieu

Sous la dépendance de l'équipement génétique de la plante, la teneur en protides du grain de blé est également conditionnée par les facteurs relevant du milieu où la plante se développe : conditions climatiques, irrigation, nature du sol, techniques culturales, engrais... ; d'aucuns sont d'avis que les conditions de développement ont, sur la teneur finale des grains en constituants azotés, une importance prépondérante par rapport aux facteurs génétiques eux-mêmes (BARMORE, 1948).

BAILEY (1925), a passé en revue les innombrables travaux entrepris en vue de préciser l'influence du milieu sur la composition azotée du blé. Il en a dégagé les conclusions suivantes :

— *Les conditions climatiques* déterminent des variations de composition plus importantes que les autres facteurs, à l'exception peut-être de l'irrigation.

— *La texture du sol* semble exercer une influence plus marquée que les variations de sa composition dans les limites rencontrées habituellement en pratique agricole et NEWTON (1953) a de nouveau montré l'influence du facteur sol sur la teneur en protides des grains des céréales.

— L'application des *engrais azotés*, particulièrement sous forme minérale, a pour effet d'accroître la teneur du blé en protides. La teneur du grain en protides est d'ailleurs fonction du stade végétatif auquel l'addition d'engrais azotés a été effectuée, l'accroissement le plus important se situant au moment de la floraison.

L'application de phosphates abaisserait la teneur en protides, alors qu'elle ne semble pas être affectée de façon notable par la potasse.

Les travaux qui ont suivi ceux mentionnés par BAILEY ont été plus particulièrement orientés vers la nutrition azotée du blé. GERICKE (1930) confirmant les observations antérieures, est parvenu à accroître la teneur en protides des épis portés par un même plant en lui fournissant des nitrates en fin de végétation. Plus récemment, GARDNER (1950) a étudié l'action des épandages azotés en couverture (top-dressings) sur le rendement et la teneur en protides du blé d'hiver, tandis que CARPENTER, HAAS et MILES (1952) ont étudié les relations entre l'azote absorbé par le blé et la teneur en azote du sol. COÏC (1950-1952 *a* et *b*) précisant les connaissances acquises dans ce domaine, a expliqué comment une nutrition azotée convenable à la période du tallage pouvait créer un besoin supplémentaire en azote se traduisant, s'il n'est pas satisfait, par une diminution de la teneur en protides du grain. Un apport tardif d'azote, par le fait même qu'il agit de façon relativement modérée sur le rendement,augmente très nettement, outre certaines autres caractéristiques du grain, sa teneur en constituants azotés. Des conclusions très voisines se dégagent du travail de LONG et SHERBAKOFF (1951) : les récoltes de blé et la qualité de la farine sont influencées par la fumure azotée, en particulier lorsque celle-ci est appliquée tardivement dans le développement de la plante. Tout en démontrant à son tour l'importance des engrais azotés minéraux, BAINS (1953) a confirmé le rôle défavorable des phosphates vis-à-vis de la composition azotée des grains : étudiant l'action des engrais commerciaux et naturels, il constate que l'emploi des superphosphates avec ou sans engrais naturels donne un grain à teneur en protides faible (9,3 p. 100 environ). Si au contraire, on complète le traitement aux superphosphates par addition de sulfate d'NH_4, on détermine un accroissement de la teneur en protides (10,5 p. 100).

Signalons un travail de CLAVER et ARRIAGA (1951) montrant que l'acide 2-4 D augmente la teneur en protides totaux du grain de blé, mais ne modifie pas la qualité boulangère de la farine. DUESO TELLO (1953) a mentionné de son côté que l'addition de lignite activé aux engrais usuels détermine un accroissement notable de la teneur des grains en gluten.

3. — **Répartition des protides dans le grain**

Avant d'aborder cette étude, il convient de faire remarquer que la teneur du grain de blé en protides peut présenter certaines variations à l'intérieur d'un même épi. KNYAGINICHEV (1936) a signalé que les grains situés au milieu de l'épi sont plus riches en protides que les grains supérieurs ou inférieurs. Une étude plus récente de LEVI et ANDERSON (1949) montre même que dans les épillets contenant 3 grains, celui du sommet est le moins riche en protides (14,7 p. 100), le grain du milieu ayant une teneur légèrement plus élevée (15,9 p. 100) que le grain inférieur (15,7 p. 100).

Les différences de composition chimique présentées par les diverses régions anatomiques des grains des céréales ont toujours été d'un grand intérêt pour les

céréalistes. En isolant du grain de blé une région cellulaire riche en azote appelée bande hyaline et assise protéique, GIRARD et LINDET (1903) semblent avoir été les initiateurs de l'étude sur la répartition du matériel azoté faisant intervenir la dissection à la main. Presque à la même époque, par des méthodes similaires, COBB (1905) a conçu un schéma de la répartition du gluten dans le grain. Plus récemment GUILLEMET et GUILBOT (1945) ont proposé une méthode chimique d'isolement de l'assise protéique faisant intervenir un traitement par l'acide formique ; la teneur en protides (N × 6) de la fraction ainsi isolée était, en p. 100 de substance sèche de 25,8. En soumettant d'autre part le grain de blé à une usure ménagée par un abrasif, des fractions d'enveloppes allant de la périphérie vers le centre du grain ont pu être isolées. Voici les teneurs en azote des diverses fractions obtenues par ce procédé préconisé dans l'Industrie des produits de régime.

	Mésocarpe endocarpe	Tégument séminal bande hyaline	Assise protéique	Gruaux bis et couches successives de l'endosperme
N % (en substance sèche)	1,60	2,26	2,27	2,20 à 1,65

Ces valeurs indiquent que la région cellulaire du grain correspondant aux appellations tégument séminal, bande hyaline et assise protéique, présente une concentration élevée en composés azotés, cette concentration diminuant à mesure que les couches cellulaires deviennent plus voisines des régions externes ou internes du grain.

MORRIS, ALEXANDER et PASCOE (1946) puis HINTON (1953) ont étudié la répartition des protides du blé après dissection à la main des différentes régions anatomiques. Voici les résultats obtenus par HINTON à partir d'un blé français (Variété Vilmorin 27).

Répartition des protides dans le grain de blé

	p. 100 du grain	Teneur en protides (N × 6,25)		Proportion des protides totaux p. 100 du grain
		p. 100	p. 100 g de grain	
Péricarpe	8	4,4	0,3	4
Couche aleurone ..	7	19,7	1,4	15,5
Endosperme 1	12,5	13,7	1,7	19,4
Endosperme 2	12,5	8,8	1,1	12,4
Endosperme 3	57,5	6,2	3,6	40,7
Embryon	1	33,3	0,3	3,5
Scutellum	1,5	26,7	0,4	4,5
Grain total	100	8,7	8,8	100

Le germe et le son sont plus riches en protides que l'endosperme et les fractions centrales de l'endosperme sont elles-mêmes plus pauvres en protides que les parties périphériques.

Voici d'ailleurs à ce sujet les valeurs publiées par BARTON-WRIGHT et MORAN (1946) qui vérifient pleinement les conclusions de HINTON. Pour un blé de teneur en azote total de 2,15 p. 100, le germe a une teneur de 5,22 p. 100, le son de 1,96 p. 100, l'endosperme périphérique de 2,30 p. 100 et l'endosperme interne de 1,91 p. 100.

4. — Dosage des protides

La méthode de KJELDAHL ou une de ses multiples variantes, a été et reste la méthode la plus employée pour déterminer la teneur en azote total du blé, de la farine et des autres produits de mouture. Elle est précise, assez rapide, mais nécessite pour les déterminations en série un appareillage fragile et coûteux ; en outre elle consomme de grandes quantités d'acides et de bases et la minéralisation s'accompagne d'émission de vapeurs nocives dont il est indispensable de se protéger.

On a donc tenté d'élaborer d'autres méthodes d'un emploi plus simple. ZELENY (1941) a proposé une méthode photométrique applicable aux blés et aux farines dont voici le principe : les protéines sont dispersées dans une solution alcaline diluée ; par neutralisation partielle et soigneusement contrôlée de la dispersion alcaline on fait passer les protéines à l'état de suspension colloïdale stable, on mesure enfin la lumière transmise au travers de la suspension. Les résultats obtenus s'accordent avec les valeurs se rapportant aux protéines du gluten [ZELENY, NEUSTADT et DIXON (1942)] et en fait cette méthode peut être considérée comme spécifique des protéines du gluten. EVA et ANDERSON (1944) ont toutefois établi que, malgré l'avantage de sa simplicité, la méthode préconisée par ZELENY comporte une erreur analytique plus élevée que la méthode de KJELDAHL.

Plus récemment PINCKNEY (1949) visant également à rendre plus simples et plus rapides les dosages en série, a proposé une méthode colorimétrique de dosage des protéines du blé et de la farine, faisant intervenir la réaction du biuret. Les protéines sont dispersées dans une solution de potasse 0,05 N et la dispersion traitée par une solution de SO_4Cu convenablement stabilisée. L'intensité de la coloration violette obtenue, qui est proportionnelle à la concentration en protéines, est déterminée au colorimètre. Bien que le dixième environ des protéines totales échappe à la dispersion, les déterminations colorimétriques sont en bon accord avec les valeurs fournies par la méthode classique de KJELDAHL. L'établissement de courbes d'étalonnage ou de tables de correction permet d'exprimer les résultats obtenus en protéines totales ou protéines dispersées, ces dernières correspondant au gluten.

BIECHY et SPINDLER (1950) de leur côté, ont proposé une méthode de dosage dont le principe repose également sur la réaction du biuret.

II. — LES PROTÉINES DU BLÉ

LE GLUTEN

Par malaxage d'un pâton de farine de blé sous un mince filet d'eau on parvient à isoler une masse ferme et élastique connue sous le nom de gluten. Une telle substance pouvant contenir jusqu'à 85 p. 100 de protides, représente la majeure partie du matériel protéique de l'endosperme du grain. Cette propriété des protéines de l'endosperme de former du gluten sous l'action de l'eau est particulière au froment et aucune autre céréale, si l'on fait exception de l'épeautre, espèce en nette régression, ne permet l'isolement d'un matériel protéique identique dans les mêmes conditions.

Ainsi que nous le verrons, les protéines présentes chez la plupart des autres

céréales sont du même type que les protéines constituantes du gluten, mais pour une raison encore inconnue, elles ne donnent pas naissance à cette masse cohésive et élastique que constitue le gluten de la farine de blé (1).

On ignore encore si le gluten préexiste à l'intérieur du grain et dans les particules de la farine ou s'il prend naissance au cours de la lixiviation.

1. — Composition

Le gluten ne représente pas la totalité du matériel protéique de la farine ; au cours de l'extraction et pendant le lavage 20 à 25 p. 100 des matières azotées de la farine sont solubilisées. Le gluten brut ainsi obtenu contient des quantités variables d'amidon, une certaine fraction de lipides, un peu de cellulose et des matières minérales. La quantité d'amidon dépend de l'efficacité du lavage et par action mécanique et prolongée on peut obtenir un gluten contenant 85 à 90 p. 100 de protides. La quantité de lipides, qui est en partie, comme la teneur en minéraux, fonction du taux d'extraction de la farine, représente de 5 à 12 p. 100 du gluten (en moyenne 6 à 8 p. 100).

Préparé par lixiviation, le gluten atteint une teneur en eau maximum de 66 à 67 p. 100 (environ 2 parties d'eau pour une partie de gluten), se répartissant en eau d'adsorption et eau d'imbibition.

Composition moyenne du gluten	p. 100 de substance sèche
Protides	75 à 85
Amidon	8 à 10
Sucres réducteurs	1 à 2
Lipides	5 à 12
Cellulose	2
Matières minérales	1

2. — Extraction et dosage du gluten

L'extraction du gluten à partir de farine de blé fut réalisée à l'origine par pétrissage à la main. On pratique en France une détermination quantitative de la teneur des farines en gluten et c'est Arpin (1902) qui a codifié la technique d'extraction quantitative. De nombreux facteurs sont susceptibles de modifier les résultats et il faut tenir compte de la quantité de farine employée, de la durée du pétrissage et du temps de repos du pâton, de la composition et de la température de l'eau, de la durée du lavage, tout en faisant intervenir le coefficient personnel de l'opérateur (Fisher-Halton (1936). On a cherché à supprimer ce dernier facteur en réalisant des appareils d'extraction mécanique. Aux États-Unis, on n'utilise pas la technique d'extraction du gluten à des fins quantitatives.

De nombreuses déterminations quantitatives ont permis de constater que la teneur en gluten de diverses farines correspond approximativement à leur teneur en protides ; ceci s'explique par le fait que la perte de constituants azotés au cours du lavage est compensée à peu près par la teneur du gluten en constituants non azotés.

Exprimée en p. 100 de farine (pour des taux d'extraction allant de 74 à 78 p. 100), la teneur en gluten des farines ordinaires oscille entre 7 et 10 p. 100, celle des farines dites de force de 12 à 15 p. 100, de la matière sèche.

(1) Lors de l'étude des autres céréales on indiquera par quel artifice on peut extraire un complexe protéique voisin du gluten.

LES PROTÉINES CONSTITUANTES DU GRAIN DE BLÉ

A. — Étude qualitative

1. — Fractionnement selon Osborne

L'importante revue bibliographique de Bailey (1944) a su fort bien mettre en évidence les diverses étapes qui, depuis l'isolement du gluten de la farine de blé par Beccari en 1728 ont marqué l'évolution de nos connaissances sur les protéines constituantes du blé. Si les travaux d'Osborne (1907) et de ses élèves ont marqué l'étape principale de cette évolution, il ne peut être question de passer sous silence, parmi tant d'autres les noms de Ritthausen (1872), Weyl et Bischoff (1880), Balland (1883), Fleurent (1896), Konig et Rintelen (1904).

Fractionnement d'Osborne

Dans sa monographie (1907), Osborne a décrit en détails les diverses méthodes qui lui ont permis d'isoler du blé ou de ses sous-produits, 5 fractions protéiques distinctes. Voici les résultats publiés par lui en 1910 concernant la composition en diverses protéines d'un blé à 9,7 p. 100 de protides.

	p. 100 du grain
1. Une albumine : la leucosine	0,4
2. Une globuline : l'édestine	0,6
3. Des proétoses	0,2
4. Une prolamine : la gliadine	4,5
5. Une glutéline : la gluténine	4

Les trois premières fractions présentant le caractère commun d'être extraites par les solutions salines diluées, ont été souvent appelées ultérieurement protéines « solubles » ou protéines du « non gluten ».

Elles ont été préparées par Osborne soit à partir de farines, soit à partir de germe où elles se trouvent en quantités plus importantes.

Les deux autres fractions, constituant le résidu protéique après l'extraction saline, ont été désignées par protéines « insolubles » ou protéines « du gluten ». Le gluten, en effet, résultant de l'élimination par l'eau de l'amidon et du matériel azoté soluble de la farine de blé, serait formé par l'association de gliadine et de gluténine. Osborne a réalisé l'isolement de ces deux protéines soit à partir de farines, soit encore à partir de glutens.

Nous donnerons un aperçu très succinct des techniques d'isolement pratiquées par Osborne.

Albumine et globuline : l'extrait salin (NaCl 10 p. 100) de farine est soumis à la dialyse ce qui provoque la précipitation de la globuline ; l'albumine est ensuite récupérée par coagulation par la chaleur. Pour les préparations de leucosine à partir de germe, l'extraction était faite par l'eau. Le plus souvent, les préparations étaient purifiées par remise en solution et reprécipitations successives.

Protéoses : extraites en très petites quantités par les solutions salines diluées avec l'albumine et la globuline. Obtenues soit en saturant par NaCl l'extrait privé de globuline, soit par addition d'un mélange ClNa 20 p. 100

acide acétique. OSBORNE a émis certains doutes sur l'origine d'une telle fraction ; on a supposé plus tard qu'elle serait le résultat d'une dégradation partielle des autres protéines au cours des opérations de fractionnement.

Gliadine : extraite par l'alcool 70 p. 100 en volume soit directement du gluten ou de la farine, soit encore après isolement de la farine des protéines « solubles ».

Gluténine : nom donné par OSBORNE à la glutéline du blé ; fut appelée initialement zimione, fibrine végétale, caséine du gluten.

Après isolement des fractions protéines solubles et gliadine de la farine, le résidu est extrait par KOH 0,1 p. 100 ; par neutralisation de la dispersion alcaline on précipite la gluténine. L'isolement peut être effectué également à partir du gluten après extraction de la prolamine, avec ou sans dispersion par les alcalis dilués.

Mettant à profit certains caractères de solubilité du matériel protéique du blé et des farines, divers chercheurs contemporains d'OSBORNE avaient individuellement réalisé l'isolement de fractions protéiques. En précisant la nature et les propriétés de telles fractions, le travail d'OSBORNE devait être à l'origine des diverses méthodes de fractionnement et d'isolement pratiquées ultérieurement par de nombreux chercheurs.

TELLER (1896), CHAMBERLAIN (1905 et 1906), avaient également réalisé l'extraction de certains constituants protéiques du blé par les solutions salines diluées. GREWE et BAILEY (1927) extraient la farine par SO_4K_2 5 p. 100.

SNYDER (1899) avait isolé une gliadine par extraction directe de la farine par l'alcool 70 p. 100. TELLER (1896) utilise l'éthanol 75 p. 100 à chaud. FLEURENT (1896) extrait la farine par l'alcool 70 p. 100 contenant 0,2 à 0,3 p. 100 de potasse ; la gluténine est précipitée en faisant barbotter CO_2 dans l'extrait ; la gliadine est déterminée par dessiccation d'une partie aliquote de la solution en déduisant le poids correspondant de CO_3Ca. KOSMIN et POPZOWA (1934 *a*) s'inspirant de cette méthode devaient disperser le gluten dans KOH 0,2 p. 100 dans l'alcool 79 p. 100 ; la gluténine était précipitée par neutralisation ; la gliadine précipitée à son tour par dilution par l'eau.

BLISH et SANDSTEDT (1925) dispersent la totalité du gluten dans la soude diluée ; en diluant par l'alcool jusqu'à une concentration de 70 p. 100 et en acidifiant on précipite la gluténine, la gliadine restant en solution.

La méthode de fractionnement pratiquée par JAVILLIER et DJELATIDES (1934) directement inspirée de celle d'OSBORNE, procède à une extraction de la farine par NaCl 10 p. 100, par l'alcool neutre, puis par l'alcool additionné de KOH 0,3 p. 100.

2. — Caractères de solubilité et de dispersion des protéines. Facteurs qui les modifient

Fondée essentiellement sur les caractères de solubilité des diverses fractions protéiques, la méthode de fractionnement d'OSBORNE, ainsi que les méthodes qui en dérivèrent, fut à l'origine d'un très grand nombre de travaux ayant pour but de préciser ces caractères de solubilité et de déterminer les facteurs susceptibles de les modifier.

Nous étudierons les recherches qui se sont adressées d'une part aux protéines solubles du « non-gluten », d'autre part aux protéines du gluten.

a) Protéines solubles du « non-gluten »

Olson (1914) constate que l'extraction par les solutions salines des protéines solubles peut affecter également la gliadine. Une fraction plus importante de la gliadine est solubilisée par ClNa 1 p. 100, que par ClNa 10 p. 100.

Gortner, Hoffmann et Sinclair (1929) extraient 12 farines différentes par des solutions aqueuses de 18 sels minéraux à diverses concentrations ; pour une farine donnée ils constatent des variations considérables de la quantité de protéine extractible par ces diverses solutions salines de concentrations ioniques équivalentes. En outre, alors que certaines solutions salines extraient seulement une fraction des protéines « solubles », d'autres extraient des quantités importantes de protéines « insolubles ». Ces résultats les amènent à considérer que la solubilité des protéines dans les solutions salines neutres est en réalité une dispersion. La quantité de protéine dispersée varie fortement selon l'agent dispersant utilisé ; l'action dispersante des anions est plus marquée que celle des cations et s'établit ainsi :

anions : $F < SO_4 < Cl <$ tartrate $< Bi < I$

cations : $Na < K < Li < Ba < Sr < Mg < Ca$.

Geddes et Goulden (1930) utilisent SO_4Mg 0,5 N pour l'extraction.

Plusieurs autres auteurs devaient ensuite apporter des précisions quantitatives sur l'influence de la nature des solutions salines utilisées pour l'extraction.

Le tableau suivant rapporte, exprimées en p. 100 des protides totaux, les quantités comparées de protéines extraites par l'eau et des solutions salines de concentration identique mais de nature différente. Ces résultats ont été obtenus successivement par Pascoe, Gortner et Sherwood (1930) (moyenne de 17 farines), par Harris (1931 *a*,*b*, *c*) (1932) (moyenne de 15 farines).

Protéines extraites
(en p. 100 des protides totaux)

Auteur	Eau	FK 0,5 N	ClK 0,5 N	BrK 0,5 N	IK 0,5 N	SO_4Mg 0,5 N	
Pascoe et coll. (1930).....		16,31	21,23	28,31		20,07	farines
Harris (1931 *a*).	19,2	15,4	21,5	32,6	47,1		farines
Harris (1931 *c*).				30,9		23,9	farine
Harris (1931 *c*).				28,7		17,1	blé broyé
			Cl Na 0,5 N				
Harris (1932)...	21,5		19,7	26,9		15,6	farine

De tels résultats rendent évidente l'influence de la nature des sels minéraux sur le pourcentage de protéines extractibles. En faisant varier la concentration des solutions salines utilisées, Rich (1933) a constaté dans certains cas une diminution de solubilité. Plus récemment, Jorgensen (1945) a rapporté que l'addition à la farine de blé de quantités de BrO_3K relativement importantes, diminuait la solubilité dans l'eau des protéines. Hagberg (1950) a trouvé que l'addition à la farine d'une solution de bromate 0,1 p. 100, diminue d'environ 20 p. 100 le taux de protéines solubles dans l'eau.

Les résultats de Jacobs (1952) avec ClO_2, autre agent oxydant améliorant des farines, aboutissent à des conclusions absolument inverses de celles de

Jorgensen et de Hagberg pour le bromate : des doses élevées de ClO_2 augmentent la solubilité dans l'eau des protéines.

Les derniers travaux en date sur les protéines « solubles » du blé et des farines, dus à Pence et coll. (1954 *a* et *b*) résument, tout en les précisant, les observations antérieures. S'il est bien établi que la fraction albumine-globuline voit sa solubilité modifiée en fonction de la nature des solutions salines utilisées pour son extraction, les variations observées, concernant la quantité de protéines extraites sont dues surtout aux modifications de solubilité dans ces diverses solutions d'une protéine du gluten : la gliadine.

Le tableau suivant emprunté aux résultats de Pence et coll. met en évidence l'action exercée par diverses solutions salines de même concentration sur les solubilités respectives des albumines, des globulines, et de la gliadine.

Teneur d'une farine de blé en albumines et globulines
(déterminées par extraction à l'aide de solutions salines 0,5 M à pH 6-7)
(en p. 100 des protides)

Sel	Protéines extraites	Albumines	Globulines	Gliadine
LiCl	22,9	8,3	6	8,7
NaF	13,5	6	4,7	1,3
NaCl	21,4	7,6	7,6	6,2
NaBr	32,7	9,6	6,5	16,7
$MgCl_2$	29,9	9,2	7,1	15,5
$CaCl_2$	27,8	8,2	6,6	14,8
$MgSO_4$	16,9	7,2	8,2	1,5
K_2SO_4	17	6,7	8	2,3
Na_3BO_4	22,6	7,7	3,7	11,2

Des divers sels utilisés, NaCl apparaît donc comme le meilleur agent pouvant réaliser l'extraction simultanée et optimum des albumines et des globulines de la farine, sans entraîner une solubilisation importante de la gliadine.

b) Protéines insolubles du gluten

On relève dans la littérature un très grand nombre de travaux qui ont tenté de préciser l'influence des diverses conditions opératoires sur la nature et la quantité des fractions gliadine et gluténine extractibles.

α) *Solubilité dans les solutions salines*

Tague avait déjà montré que la méthode de préparation exerce une influence profonde sur la solubilité de la gliadine. Nous avons déjà rapporté les observations de Olson (1914) montrant qu'une fraction plus ou moins importante de la gliadine peut être solubilisée au cours de l'extraction des protéines « solubles » par les solutions salines. Tague (1925 *b*) a déterminé la solubilité de la gliadine dans des solutions de chlorures et de sulfates ; en général, la solubilité de la gliadine était faible et augmentait avec la dilution, à l'exception de SO_4Na_2 et $MgCl_2$ pour lesquels la solubilité maximum correspondait à une concentration de 0,005 M pour SO_4Na_2 et à la saturation pour $MgCl_2$. Dill et Alsberg (1925) ont signalé d'autre part que le thiocyanate d'NH_4 1,09 M et de Na 1,06 M, ainsi que IK 5 M sont capables de donner avec la gliadine des solutions stables.

Herd (1931) a constaté que la proportion de protéine extraite par l'alcool après une extraction saline préalable dépend de la nature de la concentration saline utilisée, rejoignant ainsi les observations de Gortner, Hoffmann et Sinclair (1929).

Sinclair et Gortner (1933) ont précisé que la quantité de gliadine dispersée par une solution saline donnée dépend à la fois de la concentration en sel et de la quantité de gliadine présente. Gilbert, Durand et Gasselin (1936) ont constaté que les solutions aqueuses de perchlorates, notamment le perchlorate de Mg, dissolvent à froid un certain nombre de substances naturelles de poids moléculaire élevé parmi lesquelles la gliadine.

Plus récemment, Guastalla (1953) a noté une légère diminution de la solubilité dans l'eau de la gliadine par addition de NaCl ou NaF 0,2 p. 100 environ, observation à rapprocher de certaines constatations rapportées en 1925 par Tague.

La gliadine solubilisée par l'eau subit une dénaturation qui augmente avec la température mais qui semble freinée par NaCl ou NaF.

Selon le même auteur, le degré de solubilisation de la gliadine par l'eau diminue considérablement en présence de phytine alors qu'il demeure inchangé si on provoque par voie enzymatique la dégradation de la phytine. De tels faits semblent confirmer l'hypothèse actuellement admise selon laquelle la phytine est susceptible d'insolubiliser un grand nombre de protéines par formation de complexes. La solubilisation du gluten par l'eau n'est par contre pas modifiée en présence de phytine, ce qui laisserait supposer que les préparations de gluten contiennent elles-mêmes de la phytine.

On a rapporté par ailleurs les résultats récents de Pence et coll. (1954 *a* et *b*) concernant l'influence de la nature des solutions salines sur la solubilité de la gliadine : alors que certains sels, comme les bromures et les iodures, extraient de fortes quantités de cette protéine, ClNa et SO_4K_2 exercent une action solubilisante peu importante et de ce fait, peuvent être considérés comme les meilleurs agents d'extraction des protéines « solubles ».

β) *Solubilité dans les alcools*

On a également beaucoup étudié l'influence de la concentration en alcool et de la température d'extraction sur la quantité de gliadine extraite.

Osborne (1907) avait constaté que la solubilité de la gliadine augmentait jusqu'à une certaine concentration en alcool pour diminuer ensuite jusqu'à devenir nulle dans l'alcool absolu. Sans avoir déterminé de façon précise la concentration en alcool dissolvant la quantité de gliadine la plus élevée, Osborne avait admis qu'on réalisait une solubilisation maximum avec l'éthanol 70 p. 100 en volume. Un travail antérieur de Teller (1898), consistant à extraire directement la farine par l'éthanol aqueux à des concentrations en alcool de 40 à 95 p. 100, avait conclu que la plus forte quantité de matériel azoté est extraite par des concentrations de 40 à 60 p. 100. Chamberlain (1905) trouve que le traitement direct de la farine par l'alcool extrait davantage de protéines que si l'on opère après traitement par les solutions salines. Snyder (1907) a indiqué les quantités de protéine dissoute par des solutions alcooliques de concentrations variables et recommandait l'éthanol 70 p. 100 en poids (environ 77 p. 100 en volume). Faisant intervenir les conditions de température et de durée d'extraction, Hoagland (1911) trouve que la quantité maximum de protéine extraite correspond à une concentration en éthanol

de 57 p. 100 en volume. GREAVES (1911) recommande une concentration en alcool de 74 p. 100 (en volume) compte tenu de l'humidité de la farine. OLSON (1913) préconise l'alcool à 50 p. 100, concentration que semblent confirmer les observations de BAILEY et BLISH (1915). Selon ces auteurs l'éthanol 50 p. 100 extrait davantage de protéine que l'éthanol 70 p. 100 ; ils admettent en effet que la dispersion des prolamines dans l'éthanol est conditionnée par l'hydratation du solvant. Si la concentration en eau est trop élevée la gliadine perd la faculté de se disperser ; si au contraire c'est la concentration en alcool qui est trop élevée, c'est la protéine qui est dénaturée. ETO (1924) trouve qu'il y a solubilisation totale de la gliadine pour des concentrations en éthanol comprises entre 60 et 70 p. 100 et TAGUE (1925 *b*) aboutit aux mêmes conclusions.

SHARP et HERRINGTON (1927) constatent à leur tour que le maximum de prolamine est extrait soit par l'alcool 50-60 p. 100 à température ordinaire, soit par l'alcool 50 p. 100 bouillant. BLISH et SANDSTEDT (1929 *b*) observent que l'extraction de la gliadine par l'éthanol bouillant disperse un peu de gluténine.

Outre la solubilité dans l'éthanol, OSBORNE avait mentionné la solubilité de la gliadine dans le méthanol et l'alcool benzylique. DILL et ALSBERG (1925) outre l'éthanol 5,8 M, ont trouvé que le méthanol 12,1 M, le propanol 2,28 M et l'isopropanol 4,17 M, donnaient avec la gliadine et à 20°C des solutions stables. Ils ont signalé de même que la gliadine était solubilisée par le glycérol, l'éthylène glycol, le propylène glycol seuls ou en solution aqueuse, par des mélanges glycérol-alcool absolu et eau-méthyl éthylcétone.

Une telle diversité dans les résultats analytiques et les conclusions formulées traduisait vraisemblablement la disparité des conditions de fractionnement et d'extraction elles-mêmes ainsi que des modifications plus ou moins profondes des propriétés de la gliadine au cours des opérations.

Dès 1905, CHAMBERLAIN attribue à une coagulation des protéines le fait que le pourcentage de gliadine extrait par l'alcool 70 p. 100 est plus faible à chaud qu'à froid. DILL et ALSBERG (1925) constatent que le contact prolongé de la gliadine avec l'alcool de 75 à 85 p. 100 de concentration dénature la protéine en modifiant sa solubilité. GOTTENBURG et ALSBERG (1927) précisent que l'altération de la solubilité de la gliadine se manifeste pour des concentrations en alcool de 20, 30 et 80 p. 100 ; aux concentrations intermédiaires, l'altération est faible même aux températures élevées. Il est donc évident que l'isolement de la gliadine à l'aide des solvants alcooliques s'accompagne inévitablement d'une dénaturation plus ou moins marquée de la protéine. Cette action dénaturante de l'alcool affecte d'ailleurs la gluténine au même titre que la gliadine. Ainsi que l'ont montré KOSUTANY (1903), SHARP et GORTNER (1923), SANDSTEDT et BLISH (1933), le contact prolongé des protéines du gluten et de l'alcool aqueux dénature la gluténine au même degré que la chaleur.

3. — Dispersion des protéines du gluten par les acides et les alcalis

La méthode de fractionnement d'OSBORNE utilise la propriété que présente la gliadine d'être soluble dans l'alcool pour la séparer de la gluténine. Or, les 2 protéines constituantes du gluten présentent en outre la propriété commune d'être dispersées par les solutions acides ou alcalines diluées ; cette propriété a été mise à profit par certains chercheurs pour séparer l'une de l'autre gliadine et gluténine.

Déterminant la solubilité de la gliadine dans des solutions chlorhydriques ou sodiques de concentrations croissantes, Eto (1924) avait constaté qu'elle passe par un maximum pour HCl N/320 et NaOH N/40. Tague (1925 *b*) a trouvé pour les solutions acides, que la solubilité maximum correspondrait aux concentrations suivantes : HCl 0,01 N, SO_4H_2 0,001 N, acide acétique 1 N, cette solubilité augmentant progressivement avec le temps jusqu'à 10 jours. Mangels et Martin (1935) ont présenté une importante étude de l'action dispersante des acides sur les protéines de la farine. Pour des concentrations allant de 0,1 N à 2 N, ils ont trouvé, en ce qui concerne les acides lactique, tartrique, citrique, oxalique, que ce sont les plus faibles concentrations qui dispersent le plus de protéines ; la relation ne se vérifie pas avec l'acide acétique. Des 5 acides organiques étudiés aux concentrations 0,1 N, l'acide oxalique disperse 75 p. 100 seulement des protéines totales de la farine alors que les 4 autres dispersent environ 85 p. 100. Les acides propionique, butyrique, valérique et succinique 0,1 N ont une action dispersante voisine de l'acide oxalique (de 72 à 76 p. 100). En ce qui concerne les acides minéraux, PO_4H_3 de 0,1 N à 2 N a une action dispersante plus marquée que HCl et SO_4H_2 à la même concentration. HCl N/10 et SO_4H_2 N/10 dispersent 40 à 45 p. 100 des protéines, mais à des concentrations plus élevées (0,5 N et au-dessus) 20 p. 100 seulement des protéines sont dispersées.

Les acides organiques se révélant plus efficaces que les acides minéraux pour effectuer la dispersion des protéines du gluten, c'est l'acide acétique qui a été le plus utilisé. Guillemet et coll. (1942) ont fait remarquer que si l'acide acétique N/10 disperse plus de 95 p. 100 du gluten, la dispersion dans le cas des protéines périphériques du grain ne représente guère plus de 50 p. 100. On peut achever de solubiliser ces dernières en utilisant une solution alcaline 0,3 p. 100. De même que l'acide acétique dilué, la potasse en solution à 0,3 p. 100, selon les mêmes auteurs, solubilise la quasi totalité des protéines du gluten. Harris et Frokjer (1952) ont obtenu une meilleure dispersion du gluten dans l'acide lactique dilué que dans les acides acétique ou formique. Travaillant sur des dispersions de farine dans l'acide lactique Hagberg (1950) a constaté que le pourcentage de protéines dispersées augmente presque linéairement avec l'acidité. Exprimé en p. 100 de protéines totales, il passe de 19 à pH 6 à 73,6 à pH 4,8.

En vue d'un fractionnement ultérieur, certains auteurs ont mis à profit l'action dispersante combinée de l'alcool et des acides ou des alcalis.

Blish et Sandstedt (1929 *a*) et (1933), ont, pour préparer la gluténine, réalisé une dispersion des protéines du gluten par action combinée de l'acide acétique et de l'alcool. S'inspirant des travaux de Fleurent (1896) puis de Javillier (1934), Guillemet et coll. (1942) ont montré que, si l'alcool neutre seul solubilise environ 50 p. 100 des protéines du gluten, l'alcool potassé à 0,3 p. 100 en disperse jusqu'à 70 p. 100.

a) Action dénaturante ou hydrolytique des alcalis et des acides

De même que l'alcool s'est révélé exercer une action dénaturante sur les protéines du gluten, il est devenu très rapidement évident que l'emploi des agents de dispersion alcalins et acides était incompatible avec un fractionnement rationnel des protéines « insolubles ».

Action des alcalis

Blish et Sandstedt (1929 *a*) ont trouvé que la gluténine, préparée par des méthodes faisant intervenir la dispersion par les alcalis dilués, variait en composition chimique en fonction de la concentration en alcali. La protéine ainsi préparée avait subi des altérations se traduisant par des modifications irréversibles de ses propriétés physiques initiales.

Etudiant l'action des alcalis sur la gliadine, l'α gluténine et le gluten, Csonka et Horn (1931) ont montré à leur tour que ces protéines subissent une hydrolyse dans NaOH 0,5 N, même à température ordinaire. De même Cook et Rose (1935) devaient mettre en évidence que les solvants faiblement alcalins sont absolument impropres au fractionnement du gluten du fait qu'ils provoquent presque immédiatement des transformations hydrolytiques.

Action des acides

L'emploi des acides organiques dilués comme agents de dispersion, bien que d'action moins brutale que les alcalis, devait également se révéler néfaste.

Rose et Cook (1935) ont montré les premiers que les dispersions de gluten de blé dans l'acide acétique sont instables, instabilité se traduisant par une diminution de la viscosité avec le temps ; Cook et Rose devaient montrer qu'il s'agissait de modifications de nature hydrolytique. Selon Olcott, Sapirstein et Blish (1943), l'hydrolyse lente observée dans ces conditions serait d'origine enzymatique ; l'enzyme responsable serait sensible à la chaleur puisque les dispersions sont presque totalement stabilisées par traitement à la chaleur (5 à 10 minutes à 95-100°C). Et cependant Olcott (1950) malgré le traitement à la chaleur, constate une baisse de viscosité ; la raison n'a pu en être déterminée.

Ainsi que l'a pratiqué Blish (1936), la dispersion par l'acide acétique dilué n'est applicable qu'aux basses températures de façon à prévenir les dégradations hydrolytiques des protéines.

b) Purification du gluten de farine de blé

La propriété des acides organiques dilués et plus particulièrement de l'acide acétique de disperser les protéines insolubles du blé, a été mise à profit par certains chercheurs pour l'obtention de préparations purifiées de gluten.

Des dispersions de gluten dans l'acide acétique dilué ont été préparées directement à partir de farines par Mangels et Martin (1935). Mais d'autres auteurs, Sandstedt et Blish (1933) n'ont pu employer directement la farine. Les sels en effet, même aux faibles concentrations, affectent la solubilité du gluten dans les acides ainsi que l'ont montré Wood et Hardy (1908). Le procédé le plus pratique consiste à partir de gluten brut et à le disperser ensuite en milieu acétique dilué 0,1 N ou 0,01 N. La dispersion est centrifugée ce qui permet d'éliminer l'amidon ; la dispersion acétique est alors, soit additionnée de sels neutres, soit neutralisée, afin de reprécipiter les protéines. On récupère ainsi, après centrifugation, un gluten n'ayant subi aucune modification apparente de ses propriétés physiques et mécaniques initiales. L'opération n'est pas quantitative. Sandstedt et Blish (1933) ont constaté sur des dispersions de gluten dans un mélange acide acétique-alcool, qu'une fraction importante des protéines (12-14 p. 100) est centrifugée avec l'amidon.

LUSENA (1950 *b*) a décrit en détails la technique utilisée pour préparer du gluten à « l'état natif ». Il procède d'abord à un lavage abondant du gluten, en vue d'éliminer les sels normalement présents qui, même à des concentrations de 0,5 g par litre environ diminuent de façon appréciable la solubilité des protéines ; la dispersion est faite dans l'acide acétique 0,01 N et 0,005 N, débarrassée quantitativement de l'amidon par centrifugation, puis lyophylisée. Le gluten « natif » ainsi obtenu se présente sous forme d'une poudre blanche contenant 8 p. 100 de lipides liés.

4. — Inconvénients de la méthode de fractionnement selon Osborne

Il résulte des nombreux travaux ayant succédé à ceux d'OSBORNE, que la séparation des protéines constituantes du blé en diverses fractions faisant intervenir l'action des solutions salines, de l'alcool et des bases diluées demeure très superficielle, les facteurs déterminant la solubilisation ou la dispersion de chaque fraction protéique étant extrêmement divers et complexes.

Il semblerait, comme certains auteurs l'ont exprimé catégoriquement, que les diverses fractions obtenues dans ces conditions dépendent presque uniquement de l'agent solubilisant et de la méthode employée. Aussi serait-il préférable de substituer aux appellations classiques visant à désigner des protéines bien définies, des termes moins précis exprimant les caractéristiques de solubilité de la fraction protéique isolée dans telles ou telles conditions, comme par exemple : fraction soluble dans les solutions salines, ou soluble dans l'alcool à telle concentration et à telle température, etc...

On a vu d'autre part l'action dénaturante qu'exercent inévitablement l'alcool et les bases sur les protéines au cours du fractionnement ; comme l'ont mis en évidence SINCLAIR et MCCALLA (1937), l'alcool et les alcalis dilués dégradent le complexe lipido-protéique du gluten et modifient ses propriétés de façon irréversible.

A condition d'opérer à basse température, la dispersion des protéines par les acides organiques dilués, présente par rapport aux méthodes d'extraction préconisées par OSBORNE, un avantage certain. Il est en outre possible, à partir de la dispersion ainsi obtenue, d'isoler diverses fractions protéiques en réalisant une précipitation fractionnée par les sels, ou comme des auteurs l'ont pratiqué dans certains cas, un fractionnement par la chaleur. Nous aurons l'occasion de rencontrer de tels modes de fractionnement dans la suite de cet exposé et de décrire certaines caractéristiques des fractions protéiques ainsi isolées.

Nous allons voir d'ailleurs que l'emploi de certains solvants à réaction neutre a permis, au même titre que les acides dilués, de faire passer les protéines dites « insolubles » à l'état de dispersions homogènes, rendant possible ultérieurement la précipitation fractionnée.

5. — Dispersion des protéines par les solvants neutres

Afin d'éviter la dénaturation des protéines au cours de l'extraction, plusieurs auteurs ont en effet préconisé l'emploi de solvants neutres tels que l'urée ou le salicylate de Na, de préférence aux solvants usuels alcooliques, alcalins et même acides.

Dill et Alsberg (1925) avaient observé l'action solubilisante de l'urée vis-à-vis de la gliadine. Cook et Alsberg (1931), puis Cook (1931) utilisent l'urée pour disperser le gluten et, à partir de la dispersion obtenue, après élimination de l'amidon par centrifugation, séparent la gliadine de la gluténine soit par précipitation fractionnée à l'aide de sels, soit par l'éthanol ou le méthanol. Un peu plus tard, Cook et Rose (1934) constatent que le gluten peut être presque totalement solubilisé par le salicylate de Na 8 à 10 p. 100 et qu'il ne subit pas de modifications hydrolytiques décelables par contact prolongé. Une étude comparée des agents de dispersion du gluten acides ou alcalins avec les solvants neutres type urée ou salicylate, permet à Rose et Cook (1935) de s'assurer que l'action dénaturante de ces derniers est négligeable. Les modifications les plus marquées subies par les protéines ainsi dispersées dans les solvants neutres, se manifestent seulement à partir de 70°C (Cook et Rose (1935)).

McCalla et Rose (1935) constatent que l'on peut, par addition de sels, reprécipiter le gluten de sa dispersion dans le salicylate sans modifier ses propriétés originelles ; on peut également précipiter de façon progressive une série de fractions protéiques par additions successives de SO_4Mg. Blish (1936) a procédé à une précipitation fractionnée de dispersions de gluten dans le salicylate, l'eau, l'alcool et l'acétone.

Rich (1936) estime qu'au lieu d'être divisées en fractions arbitraires, les protéines doivent être étudiées dans leur totalité ; c'est dans ce sens qu'il utilise, pour disperser les protéines de la farine, le salicylate de Na N/4. Harris et Johnson (1940) devaient ensuite utiliser comme agents de dispersion des solutions à 10 p. 100 de salicylate additionnées de saccharose et Colvin et McCalla (1949) ont préparé des dispersions de gluten par des solutions de salicylate M/10 ou M/2. Trenton (1947) a préconisé une purification du gluten brut évitant toute dénaturation et toute hydrolyse en le dispersant dans une solution diluée ammoniacale de salicylate de Na ou de K.

Présentant sur les méthodes d'extraction préconisées par Osborne des avantages incontestables, la dispersion des protéines par le salicylate n'est malheureusement pas une méthode parfaite. En même temps que les protéines, une forte proportion d'amidon et de lipides sont également dispersés ; en outre la dissolution des protéines n'est pas complète et l'adsorption du salicylate à la surface des protéines empêche leur étude physico-chimique (McCalla (1949 et 1951)).

Depuis une dizaine d'années on a préconisé l'emploi de divers composés organiques exerçant vis-à-vis des protéines du gluten une action dispersive. Grace (1944) a trouvé que les solutions à 5 p. 100 des sels de sodium de diverses substances synthétiques, actives sur la croissance des végétaux, étaient capables de disperser le gluten de blé. Le naphtyl acétate de Na s'est révélé le plus efficace, dispersant une quantité de gluten aussi importante que le salicylate ou les bases diluées. Harris, Sibbitt et Banasick (1948) ont à leur tour présenté une étude de l'action de certaines substances hormonales sur la quantité et les propriétés des protéines dispersées de plusieurs céréales dont le blé ; confirmant les observations antérieures de Grace (1944) ils trouvent que le naphtylacétate est l'agent le plus efficace ; à des concentrations assez faibles il tend à coaguler les protéines de la farine de blé, alors qu'à des concentrations plus élevées leur solubilité se trouve accrue.

Lundgren (1947) a préconisé comme agent de dispersion du gluten dans l'eau un volume égal de détergent (alkyl-arylsulfonate ou alkyl sulfonate).

De même Foster (1949) a proposé le dodécylbenzène sulfonate de Na et l'alkylbenzène sulfonate de Na.

Un travail récent de Dedeken, Mortier et Wiame (1953) visant à solubiliser la totalité des protéines du gluten sans dénaturation, fait état du degré de solubilisation ou de dispersion du gluten lyophylisé dans divers solvants. Les auteurs solubilisent 50 p. 100 du gluten par agitation ménagée dans un mélange à volumes égaux, eau, pyridine, dioxane, acétone ou éthanol ; la solubilisation est presque complète avec les mêmes solvants si on agite fortement au Waring Blendor. Le gluten peut être reprécipité des dispersions ainsi obtenues sans altération apparente de ses propriétés initiales. La dispersion du gluten dans l'eau après agitation mécanique intense est extrêmement variable (de 3 à 50 p. 100). A pH 11, selon les auteurs, on peut obtenir une « solution » aqueuse de gluten. A température ordinaire les propriétés des protéines ainsi « solubilisées » sont modifiées, mais la transformation est négligeable à 0°C. Les auteurs émettent l'hypothèse que la solubilité du gluten est liée aux molécules pauvres en groupements ionisables.

L'emploi de la diméthylformamide 2 à 4 M en solution aqueuse et à pH 4 a permis à Vercouteren et Lontie (1954) de solubiliser à 20°C, 90 p. 100 des composés azotés du gluten et 98 p. 100 à 60°C. Les solutions obtenues sont très stables même à 0°C. Après dialyse de la diméthylformamide le gluten reste soluble dans l'eau mais les solutions ainsi obtenues rétrogradent lentement, la vitesse de rétrogradation augmentant avec la température ; à 0°C un trouble apparaît après 2 à 3 jours, après 3 heures seulement à 60°C.

Si donc, ainsi qu'en témoignent les nombreux travaux dont il vient d'être fait état, la solubilisation ou la dispersion des protéines « insolubles » du blé continue à préoccuper de nombreux chercheurs, on ne connaît encore aucun solvant susceptible de dissoudre les protéines en totalité, sans dénaturation appréciable, de façon qu'elles puissent être séparées complètement des impuretés non protéiques soit par filtration, soit par précipitation sélective, et récupérées en ayant conservé intégralement leurs propriétés originelles.

Nous verrons ultérieurement que, dans les quelques cas où on est parvenu à une solubilisation totale, les protéines ont été inévitablement dénaturées.

Influence de l'origine du gluten sur ses propriétés de dispersion

Certaines observations permettent de supposer que les propriétés de dispersion des protéines du gluten sont fonction de la nature même du gluten.

Harris et Johnson ont mis en évidence des variations sensibles des propriétés de dispersion de glutens extraits de blés de variétés différentes (1940) et de récoltes différentes (1941). La vitesse de dispersion dans le salicylate 10 p. 100 des différents glutens examinés serait liée à la fois à la variété et aux conditions du milieu (sol, climat). Harris, Olson et Johnson (1942), montrent que les glutens des blés riches en protides ont tendance à se disperser plus lentement que ceux provenant de blés à teneur en protides plus faible. Selon Harris et Frokjer (1952) le gluten d'un blé « Hard Red Spring » se disperse beaucoup plus vite dans l'acide lactique dilué que celui des types « Durum », et sa solubilité s'étend sur une zone de pH plus grande.

B. — Étude quantitative

I. — Composition du blé en protéines

Les travaux d'Osborne n'ont pas cherché à déterminer les proportions des différentes protéines du blé. Bien que non quantitatives, ses méthodes d'isolement lui ont permis de noter que le germe contenait des proportions relativement importantes d'albumine, globuline et protéoses, et que gliadine et gluténine pouvaient être considérées comme les protéines type de l'endosperme.

Nous allons passer en revue les résultats essentiels obtenus par divers chercheurs concernant soit le blé soit la farine soit encore certaines régions particulières du grain.

a) Protéines « solubles »

Osborne évaluait à 0,3-0,4 p. 100 la teneur du grain de blé en leucosine, et à 10 p. 100 celle d'un germe commercial ; Kalning (1917) en opérant sur des germes purifiés a trouvé que près de la moitié des protéines étaient solubles dans l'eau.

Estimée par Osborne à 0,6 p. 100 du grain l'édestine atteindrait une concentration de l'ordre de 5 p. 100 dans le germe.

Jones et Gersdorff (1923) et (1925) ont préparé à partir du *son* des fractions protéiques présentant les caractères de solubilité des albumines et des globulines, dont les proportions sont les suivantes :

	p. 100 du son	p. 100 des protéines totales
Albumine	2,87	16,64
Globuline	1,66	9,62

Staker et Gortner (1931) déterminent les proportions d'albumine et de globuline sur la *mouture entière* de blés de plusieurs variétés ; voici les valeurs moyennes rapportées :

	p. 100 du blé	p. 100 des protéines totales
Albumine	0,69	4,41
Globuline	3,93	25 —

Teller et Teller (1932) ont indiqué les proportions respectives d'albumine et de globuline contenues dans le *blé*, la *farine* et le *son*.

Voici leurs résultats exprimés en p. 100 d'N total.

	N albumine	N globuline
Blé	8,7	3,6 à 10,5
Farine	5,2 à 5,8	3,1 à 5,2
Son	19 à 22,4	16 à 16,6

Les résultats publiés par Chabot (1940 *a*) ont été obtenus à partir de 12 *farines* extraites de variétés de blé différentes et font ressortir des différences marquées entre les échantillons analysés.

	p. 100 de farine	p. 100 des protéines totales
Albumine (extr. eau 18 h)	1,228 à 1,634	11,3 à 19,2
Globuline (extr. SO_4K_2 5 % 18 h)	0,007 à 0,725	2,5 à 6,9

Hagberg (1950) a trouvé que, selon les conditions d'extraction (tempé-

rature, durée de contact) l'eau solubilise de 14 à 22 p. 100 des protéines totales de la farine.

De l'ensemble de ces résultats, qui reflètent la diversité des conditions d'extraction, un fait peut toutefois être dégagé : les parties périphériques du grain et le germe contiennent une proportion de protéines solubles beaucoup plus forte que l'endosperme. On peut évaluer de façon très approximative à 15 p. 100 des protéines totales la teneur moyenne d'une farine en protéines « solubles », à 20 p. 100 celle du blé entier, et à 35 p. 100 celle du son.

L'A. O. A. C. (1940) a précisé les conditions d'extraction des protéines solubles totales de la farine dans SO_4K_2 5 p. 100. Une autre méthode type destinée à déterminer les teneurs en albumine, globuline et azote aminé, fait intervenir une extraction par NaCl 1 p. 100. On dose l'N aminé après avoir précipité les protéines de l'extrait par l'acide phosphotungstique.

Il ne semble pas toutefois que les auteurs précédemment cités aient, lors de la détermination quantitative des albumines et des globulines du blé et des farines, tenu compte de la solubilisation partielle plus ou moins importante de la gliadine au cours de l'extraction par les solutions salines. Nous avons déjà signalé les travaux récents de PENCE et coll. (1954 *a* et *b*) à ce sujet, et leurs observations les ont conduits à préconiser une méthode de dosage des albumines et des globulines de la farine permettant d'éliminer cette cause d'erreur. Les teneurs d'une farine en globulines et albumines peuvent être déterminées avec une approximation de ± 10 p. 100, d'après les teneurs caractéristiques en tryptophane et N amidé des fractions albumine, globuline et gliadine, après extraction par ClNa ou SO_4K_2 0,5 M. Les proportions des 3 types de protéines contenues dans un extrait salin de farine sont calculées à partir de ses teneurs en tryptophane et N amidé.

Par cette méthode PENCE et coll. ont trouvé que les teneurs en « protéines solubles » de 32 farines de types et de qualités boulangères très différents, s'échelonnaient de 13 à 22 p. 100 environ des protides totaux de la farine, la proportion de l'albumine étant, en général, plus élevée que celle de la globuline. Voici leurs résultats mentionnant en outre la teneur en azote non protéique des farines examinées :

Composition en « protéines solubles » de 32 farines différentes

Protides totaux (N × 5,7)	N non protéique (en p. 100 N total farine)	Albumine, globuline (p. 100 des protides de farine)		Rapport $\frac{\text{Albumine}}{\text{Globuline}}$
5,7 à 14,2	1,3 à 3,2	6,8 à 11,5	5,7 à 10,8	0,74 à 1,60
Moyenne 9,1	2,1	9,1	8,3	1,14

Les teneurs en albumine et globuline, de même que le rapport albumine / globuline, varient d'une farine à l'autre. On a constaté en outre que la quantité de « protéines solubles » s'accroît avec la teneur en protides de la farine mais que la relation est inversée si on les exprime en p. 100 des protides totaux.

b) PROTÉINES DU GLUTEN

Dans la plupart des préparations d'OSBORNE la gliadine représentait un peu moins de la moitié des protéines de l'endosperme. Dans les premiers travaux, la gluténine a été le plus souvent estimée par différence après extrac-

tion de la gliadine. Les résultats, là encore, traduisent les variations importantes signalées au cours du travail de fractionnement.

Gliadine

Selon OSBORNE, TELLER aurait évalué entre 34 et 42,5 p. 100 des protéines totales la teneur du grain de blé en gliadine et SHEPARD de 40 à 50 p. 100. Selon KRETOWITZ et RIAZANCEVA (1935) la gliadine représenterait 58 p. 100 des protéines totales du blé.

En ce qui concerne les farines, leur teneur en gliadine, pour une méthode donnée d'extraction, varierait dans de fortes proportions. THATCHER (1907) a trouvé, exprimées en p. 100 des protéines totales, des teneurs allant de 32,5 à 55,5 p. 100. TELLER (1896) aurait même signalé une farine ayant une teneur en gliadine représentant 64 p. 100 des protéines totales. Plus récemment, CHABOT (1940 *a* et *b*) a trouvé, pour 12 échantillons de farine différents, des teneurs en gliadine représentant de 3,60 à 6,13 p. 100 de la farine.

La fraction prolamine extraite du son de blé par JONES et GERSDORFF (1923-1925) à côté des fractions albumine et globuline, représentait 51 p. 100 des protéines totales extraites.

De nombreuses déterminations de gliadine ont été effectuées directement sur le gluten. BLISH (1916), ZINN (1923), SHARP et GORTNER (1923), GREW et BAILEY (1927). Les valeurs rapportées par KOSMIN et POPZOWA (1934 *a*) sont comprises entre 50,5 et 54, 8 p. 100 du gluten en provenance de blés de force et de 43,4 à 59,8 p. 100 du gluten extrait de farines faibles. Les teneurs en gliadine des glutens en provenance de 12 variétés de blés différents déterminées par CHABOT (1940 *b*) s'échelonnent entre 65,9 et 76,4 p. 100. Il convient donc, considérant la diversité des résultats obtenus, d'accepter avec certaines réserves les pourcentages de protéines déterminés à partir du gluten dont l'extraction est soumise à tant de variations, le lavage à l'eau solubilisant une partie plus ou moins importante de la gliadine.

En ayant soin de ne pas employer le terme gliadine, l'A. O. A. C. a défini les conditions d'extraction permettant de déterminer les protéines solubles de la farine dans l'alcool à 70 p. 100 en volume.

Gluténine

SHARP et GORTNER (1923) ont trouvé que la teneur en gluténine de 11 farines différentes était comprise entre 4,19 et 7,45 p. 100 ; la fraction gluténine a été calculée par différence après extraction par SO_4K_2 5 p. 100 et éthanol 70 p. 100.

TELLER et TELLER (1932) rapportent également la teneur en gluténine du blé et de ses dérivés, les teneurs ayant été également calculées par différence après dosage des autres fractions :

	blé	farine	sons
N gluténine (p. 100 d'N total)	26,5 à 26,8	20,4 à 26,7	23,4 à 26,2

La proportion de gluténine par rapport aux protéines totales serait à peu de chose près la même dans le péricarpe et l'endosperme.

La fraction gluténine déterminée par CHABOT (1940 *a* et *b*) sur 12 farines différentes par action de HCl N/5 après élimination des fractions protéines « solubles » + gliadine, représente 1,51 à 2,24 p. 100 de la farine.

Selon la méthode officielle de l'A. O. A. C. (1940), la teneur en gluténine d'une farine s'établit en soustrayant de l'N total la somme (N sel soluble + N alcool soluble). Une seconde méthode adoptée par l'A. O. A. C. fait intervenir une dispersion des protéines par $Ba(OH)_2$, suivie d'une précipitation de la gluténine par le méthanol, la protéine étant encore dosée par différence.

Une autre méthode proposée en 1941 procède à une dispersion des protéines de la farine dans une solution sodique diluée, suivie d'une addition de méthanol; on filtre et le filtrat est acidifié par HCl à pH 6,4 : la gluténine précipite. On dose directement l'N du précipité.

Plutôt que de rapporter leurs résultats à une protéine déterminée, plusieurs auteurs tenant compte de l'influence considérable des conditions d'extraction, ont préféré indiquer la teneur en azote des fractions obtenues en précisant la nature et la concentration des solvants utilisés. C'est ainsi que Csonka (1937 *a*) rapporte les proportions des diverses fractions extraites à partir de plusieurs variétés de blé ; nous indiquons ci-après les valeurs extrêmes.

	N extrait (en p. 100 de l'N total)
Extrait NaCl 1 %	24 à 26,8
Extrait éthanol 60 %	32 à 38,5
Extrait éthanol acide	14,5 à 20,5
Résidu	15 à 19,2

Parallèlement aux teneurs en « protéines solubles » concernant 32 farines différentes, Pence et coll. (1954) ont indiqué pour les « protéines insolubles » du gluten des teneurs comprises entre 76,4 et 84,9 p. 100 des protides totaux et de la farine (moyenne 80,5).

2. — Facteurs modifiant la composition en protéines

Divers travaux ont mentionné que les proportions relatives des protéines constituantes du blé étaient sujettes à certaines variations, le plus souvent déterminées par la variété du blé considéré. C'est ainsi que Kniaginicev et Gorelkina (1937) étudiant la composition du complexe protéique de différentes variétés de blés, ont observé des différences d'une variété à l'autre. Les résultats obtenus par Chabot (1940 *a* et *b*) sur 12 variétés de blé, semblent montrer que la teneur en albumine est d'autant plus faible que la teneur du blé en protides est plus élevée ; par contre il ne se dégage pas de relation apparente entre la teneur en protides et la teneur en protéines solubles (albumine + globuline). Pereira (1945) a constaté d'autre part et pour une même variété, que la teneur en protides totaux diminue parallèlement à la teneur en gluténine alors que les fractions gliadine, globuline et albumine subissent peu de variations.

Il n'est guère possible de dégager des conclusions générales des observations parfois divergentes rapportées par les chercheurs qui se sont préoccupés de cette question, les facteurs qui conditionnent la teneur en protides d'un blé étant eux-mêmes extrêmement complexes et divers.

Il semble toutefois que non seulement les quantités de gluten extractibles soient d'autant plus fortes que les teneurs en protides sont plus élevées, mais encore que le rapport protéines du gluten/protéines du non gluten augmente avec la teneur en protides totaux.

Ainsi que l'ont montré par ailleurs Jones et Gersdorff (1939 et 1941), la conservation du blé ou de ses produits de mouture peut s'accompagner de

modifications importantes affectant les protéines : exception faite des phénomènes de nature protéolytique, on assiste en effet à une diminution du taux des albumines, globulines et gliadine. Mais les auteurs n'ont pas vérifié si le grain ne servait pas de milieu de culture aux micro-organismes qui le parasitent normalement.

III. — PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES

A. — Protéines du « non-gluten » et protéines du gluten

1. — Protéines solubles. Albumines, globulines

Point isoélectrique

On a constaté d'une façon générale que le point isoélectrique des albumines se situait dans une zone plus acide que celui des autres protéines du blé.

LUERS et LANDAUER (1922) ont indiqué pH 4,6 et PEARSALL et ERVING (1924) pH 4,5. Pour une albumine extraite du son, CSONKA, MURPHY et JONES (1926) ont trouvé pH 4,6.

Le point isoélectrique des globulines du blé est déplacé vers les pH plus élevés. Les précédents auteurs ont donné pH 5,5 pour une globuline extraite du son et selon QUENSEL, le point isoélectrique des α et β globulines du blé est respectivement situé à pH 5 et 5,7.

Les résultats les plus récents dans ce domaine ne semblent pas s'accorder avec les premières déterminations. PENCE (1953 *b*) a déterminé par électrophorèse sur papier les mobilités approximatives et le point isoélectrique de 11 constituants apparemment individuels de la fraction albumine de farine de blé. En se basant sur leur migration à des pH divers, les albumines de la farine ont été divisées arbitrairement en 3 groupes α, β et γ. La zone du pH_i pour le groupe α s'étend de 4,5 à 4,8 environ, celle du groupe β de 4,9 à 5,8 et celle du groupe γ de 6,5 à 8,8 environ.

Poids moléculaire

Les seuls renseignements concernant la valeur du poids moléculaire de la fraction albumines, ont été fournis tout récemment par PENCE et ELDER (1953). Le poids moléculaire moyen apparent des diverses fractions albumines identifiées est d'environ 28 000 dans les solutions salines ; il s'abaisse à environ 17 000 en présence d'urée ou de salicylate.

Selon DANIELSSON (1949), le poids moléculaire de la γ globuline de l'embryon de blé, déterminé par ultracentrifugation serait de l'ordre de 210 000.

2. — Protéines insolubles

Gliadine

La gliadine semble avoir été la plus étudiée de toutes les protéines du blé, vraisemblablement en raison de la facilité avec laquelle elle peut être extraite par l'alcool dilué. Les valeurs de pouvoir rotatoire spécifique rapportées dans la littérature varient considérablement selon les préparations (cf. BAILEY 1944).

Point isoélectrique

Une grande diversité de méthodes ont été employées par de nombreux chercheurs pour déterminer le point isoélectrique de la gliadine. La divergence des résultats a sans doute pour origine une connaissance insuffisante des propriétés physico-chimiques des complexes moléculaires.

Point isoélectrique de la gliadine

Méthode	pH_i	Auteurs
Floculation et électrophorèse	9,23	*Rona et Michaelis* (1910).
Précipitation de solution alcoolique	3,5 à 5,5	*Pearsall et Ewing* (1924).
Floculation en solutions tampons	6,6	*Eto* (1924).
Solubilité	6,5	*Tague* (1925*a*).
Potentiométrique	5,76	*Hoffman et Gortner* (1925).
Fixation acides ou bases	6,97 — 7,60	»
Floculation	6,20 — 6,45	*Csonka-Murphy et Jones* (1926).
Floculation et précipitation	6,41 — 6,59	*Kondo et Hayashi* (1931).
	6,2 — 6,4	*Wiazonnicka* (1933).

On peut admettre que la valeur moyenne du point isoélectrique défini selon les auteurs par solubilité ou dispersion minimum ou par floculation maximum, se situe aux alentours de pH 6,5. Kempt et Rideal (1934) ont montré que le point isoélectrique de la gliadine dépend de la concentration en électrolyte. Kondo et Hayashi (1931) n'ont pas constaté de différences dans les pHï de gliadines d'origines différentes et concluent que toutes ont des caractéristiques identiques.

Poids moléculaire et structure

Le tableau qui résume le travail de divers chercheurs dans ce domaine montre la diversité des résultats obtenus.

Méthode	Poids moléculaire de la gliadine	Auteurs
Dosage du S	15 568 (min)	*Osborne* (1907).
Dosage acides aminés	20 700 (min)	*Cohn, Hendry et Prentiss* (1925).
Température, précipitation	40 400	*Haugaard et Johnson* (1930).
Constante diffusion	27 500	*Lann et Polson* (1936).
Équilibre sédimentation	34 500	*Krejci et Svedberg* (1935).
Temps relaxation	26 800	*Arrhenius* (1937).
Pression osmotique :		
Éthanol 50-70 %	40 900	*Burk* (1938).
Urée 6,66 M	44 200	»
Glycérol 75 %	67 000	»
Uréthane 15 %	75 300	»
Sédimentation diffusion	43 000	*McCalla et Gralen* (1940).
Ultracentrifugation	28 000	*Saverborn, Danielsson et Svedberg* (1944).

Cohn, Hendry et Prentiss (1925) ont déterminé une valeur minimum de poids moléculaire en prenant comme éléments constituants certains acides aminés. Greenburg et Schmidt (1923-24) avaient obtenu des valeurs voisines d'après des déterminations de capacité de fixation de base. Cohn (1925) a admis que le poids moléculaire réel probable serait de 125 000 soit 6 fois la valeur minimum déterminée expérimentalement. Krejci et Svedberg (1935) admettent qu'à des pH supérieurs ou égaux à 2,3 et à des températures égales

ou inférieures à 20°C, la gliadine serait un mélange de molécules entières (Pm : 34 500) et de demi molécules (Pm : 17 250). Aux températures et aux acidités plus élevées la dissociation en demi molécules serait complète. BURK (1938) considère que la gliadine en solution dans le glycérol et l'uréthane forme des agrégats moléculaires résultant d'une coagulation ; contrairement à ce qui se produit avec d'autres protéines, les molécules de gliadine en solution dans l'urée ne seraient pas dissociées en unités de poids moléculaire plus faible.

BULL (1941) préconise l'emploi de la méthode de vitesse de sédimentation pour la détermination des poids moléculaires. La configuration de la molécule de gliadine, de poids moléculaire = 27 500 serait asymétrique, en forme de bâtonnet. Le rapport axial serait de 11 pour la molécule à l'état anhydre et de 7,3 à l'état hydraté. BARMORE (1947) travaillant sur des dispersions de fractions purifiées de gluten a obtenu, d'après des déterminations de viscosité, des valeurs de rapports axiaux de 15 à 26.

KOLESSOV (1951) a déterminé de façon indirecte la longueur moyenne des chaînes polypeptidiques de diverses préparations de prolamines de céréales par dosage des groupements aminés totaux et terminaux. Pour la gliadine, il a trouvé qu'une chaîne polypeptidique pouvait contenir de 12 à 15 restes d'acides aminés et que, par suite, la molécule de protéine serait constituée d'une association de polypeptides relativement courts.

Signalons enfin que la gliadine présente des propriétés moussantes et, à ce titre, peut être employée comme succédané du blanc d'œuf. SAGI (1954) a indiqué que le système colloïdal que forme la gliadine dans l'eau vers pH 6,5 donne, après agitation une mousse abondante dont la structure est voisine de celle du blanc d'œuf battu.

GLUTÉNINE

Point isoélectrique

La détermination du point isoélectrique de la gluténine du blé et des glutélines en général, est rendue plus imprécise encore par les difficultés de préparation de la protéine. Le tableau suivant résume les résultats obtenus par diverses méthodes.

Méthode	pH_i	Auteurs
Précipitation	4 — 4,5	*Pearsall et Ewing* (1924).
Précipitation	6,8 — 7	*Tague* (1925*a*).
Précipitation	4,4	*Blish* (1925).
Précipitation de dispersion alcaline	5,2 — 5,4	*Blish et Sandstedt* (1925).
Précipitation de dispersion éthanol 68 %		»
NaOH N/10	5,8 — 6	»
Floculation	6,45	*Csonka et Jones* (1927).
Floculation	5,19 — 5,58	*Kondo et Hayashi* (1931).

Ces résultats ne sont guère concordants, les préparations étant toujours plus ou moins altérées au cours de l'isolement. Aussi est-il difficile de pouvoir en déduire une valeur moyenne même approximative.

KONDO et HAYASHI (1931) n'ont pas constaté de grandes variations dans les valeurs de pH_i de gluténines extraites de farines de blés de diverses variétés (pH 5,2 à 5,6) bien que la teneur de ces farines en protides totaux varie du simple au double (de 7,3 à 14,8).

Poids moléculaire

Cohn, Hendry et Prentiss (1925) ont déterminé les valeurs minima du poids moléculaire de la gluténine d'après les teneurs de la protéine en certains acides aminés ; les valeurs obtenues sont de l'ordre de 36 000. Barmore (1947) a calculé les rapports axiaux et a trouvé une valeur moyenne de 47. Que des valeurs si élevées soient considérées ou non comme précises, elles sont l'indice d'une molécule à forme allongée en bâtonnets.

B. — Le gluten

1. — Propriétés colloïdales, gonflement, viscosité

Nous avons vu précédemment en quel sens les caractéristiques de solubilité et de dispersion du gluten ont été mises à profit pour réaliser le fractionnement et l'isolement de ses protéines constituantes. En ce qui concerne ses propriétés physiques proprement dites, l'étude en a été faite le plus souvent en relation avec les propriétés physiques et mécaniques des pâtes boulangères. On admet en effet que les qualités plastiques et élastiques du milieu très complexe que constitue la pâte, sont déterminées par les propriétés physiques de leur constituant protéique essentiel : le gluten. D'importants progrès ont été faits au cours des dernières décades dans le développement des méthodes physiques destinées à mesurer les propriétés mécaniques des pâtes et du gluten ; « toughness » (élasticité coriace), cohésion, « brittleness » (caractère cassant), élasticité, « pliability » (extensibilité) ainsi que dans la connaissance des processus biologiques et biochimiques éventuellement reliés aux propriétés colloïdales et rhéologiques des pâtes boulangères. Nous verrons à ce sujet, dans un chapitre ultérieur, en quel sens il est possible actuellement de relier la valeur boulangère d'un blé ou d'une farine aux propriétés physiques de leur gluten.

Wood et Hardy (1908) semblent avoir été les premiers à entreprendre l'étude des propriétés colloïdales du gluten et de son comportement en présence de diverses concentrations de sels d'acides ou de bases de nature différente. En 1915-1916 Upson et Calvin mesurent l'imbibition du gluten par l'eau et déterminent l'influence des acides, bases et sels. Sharp et Gortner (1923), se basant sur la capacité d'hydratation des farines, estiment que les farines fortes constituent des gels colloïdaux plus parfaits que les farines faibles et que ces différences peuvent être mesurées par des déterminations de viscosité sur les suspensions de farine dans l'acide lactique dilué ; selon eux, la gluténine serait principalement responsable du pouvoir d'imbibition marqué de la farine et du gluten. Le fait selon lequel la gluténine est dénaturée beaucoup plus facilement par la chaleur que la gliadine tendrait à démontrer que cette protéine est bien le facteur le plus important intervenant dans les propriétés colloïdales du gluten.

Les travaux de Bunjenberg de Jong et Klaar (1930-31-32) fondés sur le concept de coacervation et de coagulation mutuelle entre molécules (de charges électriques différentes) ont tenté de préciser si les propriétés physiques du gluten sont la résultante du mélange physique de ses protéines constituantes gliadine et gluténine, ou si un facteur supplémentaire conditionne ces propriétés. Par des tests de viscosité et d'opacité, ils ont étudié les propriétés colloïdales de la gliadine et de la gluténine et de divers mélanges de ces deux protéines à

divers pH. Les propriétés physiques des deux protéines se sont révélées très dissemblables ; celles des mélanges suivent une loi additive sauf aux valeurs de pH correspondant au point isoélectrique des protéines. Dans cette zone de pH, la gliadine a une charge positive, la gluténine une charge négative, alors qu'aux autres valeurs de pH les protéines sont de même signe. L'interaction est maximum vers pH 6,1 ; le gluten ne serait alors pas constitué d'un simple mélange physique de gliadine et gluténine, mais d'un complexe résultant de l'interaction des deux protéines constituantes. Les propriétés du complexe gluten seraient influencées alors d'une part par les protéines solubles de la farine, d'autre part par les dimensions relatives des particules de gluténine.

Selon GERSHZON (1937), les molécules de gliadine et de gluténine seraient hydrophobes extérieurement et hydrophiles intérieurement ce qui expliquerait leur capacité d'absorption d'eau et de gonflement. KULMAN (1937) considère que le gonflement serait principalement de nature osmotique et dépendrait du degré d'agrégation des fractions composantes.

Le gluten isoélectrique montre de la cohésion ; lorsqu'il a atteint son absorption d'eau maximum (environ deux parties d'eau pour une partie de gluten) il n'est plus collant. Lorsqu'il est dispersé par les solutions acides, son pouvoir de gonflement et d'absorption est fortement accru et les forces de cohésion rompues. Ces forces de cohésion seraient, selon VAN DER DUSSEN et MAASKANT (1938) du même type que les forces provoquant la dispersion du gluten.

HARRIS et JOHNSON (1940) ont déterminé les viscosités des dispersions de gluten de diverses variétés de blés et leurs vitesses d'écoulement à différentes pressions. Leurs résultats confirment les observations de GORTNER et DOHERTY (1918) et de SHARP et GORTNER (1923) relatives aux différences de propriétés physico-chimiques existant entre des glutens de blés durs ou tendres, et leur relation avec l'état colloïdal des protéines. Selon le travail de GUILLEMET et coll. (1942) le graphique traduisant la précipitation d'une dispersion lactique de gluten en fonction d'additions croissantes de soude, fait apparaître entre pH 5 et 6 une solubilité minimum pouvant être considérée comme le point isoélectrique. Dans le cas de dispersions formiques, la solubilité minimum se situe vers pH 4. GEERDES et HARRIS (1952) ont comparé certaines propriétés physico-chimiques des protéines de deux variétés de blé : vitesse et capacité d'hydratation, vitesse de sédimentation et viscosité. Les résultats très différents d'une variété à l'autre, indiqueraient que les molécules protéiques de l'une sont plus asymétriques que celles de l'autre.

UDY (1953) a signalé que les différences de viscosité présentées par des dispersions de gluten pouvaient être conditionnées par des propriétés électrostatiques différentes des molécules protéiques. Ce même auteur (1954) a tenté de préciser la nature des forces électrostatiques en cause en mesurant les groupements acides et basiques de diverses fractions protéiques du blé par une technique de fixation de colorants. Pour une fraction protéique donnée, les groupements acides et à un degré moindre, les groupements basiques, présentent vis-à-vis des colorants une capacité de fixation constante, quelle que soit la variété du blé étudiée. L'auteur conclut que les différences de viscosité des protéines du gluten après dispersion ne relèvent pas des forces de valence intervenant dans la réaction de fixation des colorants, mais probablement de forces moléculaires plus faibles.

2. — Structure du gluten

Nos connaissances sur la structure du gluten dans la pâte sont peu étendues. On admet que l'élasticité est conditionnée à la fois par de longues chaînes polymères et par des liaisons unissant ces chaînes linéaires pour former une structure à trois dimensions. Les protéines du gluten dans la pâte comportent sans doute des polymères linéaires de structure polypeptidique. Toutefois, il n'existe que peu de données expérimentales sur la nature des liaisons interchaînes.

La présence de liaisons du type salin est vraisemblable si l'on tient compte de la solubilisation facile du gluten par les acides et les alcalis. L'existence de liaisons hydrogène est également admise. On considère enfin comme unité structurale importante des molécules protéiques l'existence d'un troisième type de liaison interchaîne : il s'agit de la liaison disulfure (—S—S—), liaison forte mais pouvant être facilement rompue dans certaines conditions. Chez certaines protéines comme la kératine de la laine ou des cheveux, on considère que les liaisons disulfure sont une caractéristique de leur structure fibreuse et élastique. Il n'est pas impossible que de telles liaisons jouent un rôle similaire dans la structure des protéines du gluten.

Une conception récente, formulée par Hlynka et coll., laisse entrevoir que la structure des protéines de la pâte peut être conditionnée, non seulement par des liaisons disulfure entre les chaînes polypeptidiques, mais encore par des liaisons mettant en jeu les sucres réducteurs de la pâte et les protéines elles-mêmes. De telles liaisons seraient susceptibles de s'établir entre les groupes carbonyl des sucres réducteurs et les groupements aminés et amidés des protéines.

Les premiers résultats obtenus par Hlynka et Bass (1949) semblent en effet favorables à l'existence de liaisons protéines-sucres. Bien que la réaction nécessite un contact prolongé entre les constituants, ces auteurs sont en effet parvenus à mettre en évidence une réaction de la pâte et du gluten avec le glucose. La valeur réductrice d'un mélange farine-glucose, dans leurs conditions expérimentales, se trouve ainsi accrue de quatre fois, celle d'un mélange gluten-glucose de huit fois. Le fait que le pouvoir réducteur du gluten ainsi traité n'est pas modifié par lavage démontre bien qu'il s'est opéré une réaction entre les deux corps. Des résultats ultérieurs semblent avoir confirmé ces observations préliminaires.

Hlynka et Anderson (1951) ont montré que la teneur de la farine en protéines tient un rôle important dans la réaction protéine-sucre. C'est pour les farines les plus riches en protéines que l'accroissement de la valeur réductrice est le plus marqué après un contact d'environ six mois. Si les auteurs ont pu montrer que la réaction protéine-sucre se produit effectivement dans la farine et la pâte séchée entre les protéines et le gluten ajouté expérimentalement, ils n'ont pu toutefois établir jusqu'alors que les sucres de la farine réagissent. Il n'est cependant pas interdit d'envisager que les liaisons protéines-sucres représentent une partie du schéma général des processus chimiques complexes intervenant lors de la formation de la pâte et dans la détermination de ses propriétés.

Hess (1953 *a*) a publié une intéressante étude des propriétés physico-chimiques du gluten comparées à celles d'une protéine, isolée également de l'endosperme à partir de farine, mais sans intervention d'eau.

Par des recherches microscopiques, Hanssen (1952) a trouvé que les protéines de l'endosperme du blé et d'autres céréales (orge, seigle, maïs) ont une structure lamellaire définie. En employant des mélanges appropriés de solvants

organiques, HESS sépare une protéine non hydratée dont la surface spécifique est de 6,29 m^2/g ; la surface moyenne des particules de 50 μ^2. Les particules isolées de la protéine peuvent être considérées comme des cylindres ayant une base de 50 μ^2 et une hauteur correspondant à l'épaisseur des lamelles protéiques soit 0,26 μ. La protéine ainsi isolée diffère totalement du gluten séparé de la farine par lavage à l'eau : au cours du gonflement dans l'eau, elle subit un étirement discontinu des mailles de 45-55 Å à 90 Å environ ; dans les mêmes conditions le gluten subit un étirement continu de 45 Å à 55 Å. En outre, alors que le volume de la protéine au cours du gonflement s'accroît d'environ 25 p. 100, celui du gluten s'accroît de 200 p. 100. Il existe donc, selon l'auteur, une différence fondamentale de structure entre la protéine étudiée et le gluten et les actions mécaniques intervenant au cours de la transformation de cette protéine en gluten, déterminent une altération de sa structure. HESS émet une hypothèse expliquant la formation et le comportement du gluten en fonction de la structure chimique connue de la protéine du blé et des structures physiques fondamentales des molécules du même type.

Tout en mettant en relief la possibilité d'une modification de structure des protéines, les observations de HESS, lors de l'isolement du gluten, rejoignent les conceptions actuellement admises tendant à attribuer aux molécules protéiques du gluten une forme allongée en bâtonnet. On sait que la relation entre la viscosité et la concentration d'une solution de protéine est une mesure de la symétrie des particules protéiques. On admet généralement que les particules protéiques en solution sont ellipsoïdes et qu'à partir de la viscosité de la solution on peut calculer l'asymétrie de l'ellipse, c'est-à-dire le rapport des axes. L'application de ce principe par NEURATH (1939) à des solutions de gliadine, l'a conduit à attribuer à la protéine un rapport axial de 7,3 contre 1,5 pour la lactalbumine ; d'autres travaux comparant la gliadine et l'albumine d'œuf, ont indiqué les valeurs respectives de 10,5 et 5. Nous avons signalé précédemment les valeurs indiquées par BULL (1941) pour la gliadine, par BARMORE (1947) pour la gluténine et le gluten. Travaillant sur des dispersions de gluten, CUNNINGHAM (1953) a trouvé à son tour des rapports axiaux voisins de 20. Ces divers résultats impliqueraient donc que les molécules protéiques du gluten ont une forme allongée, l'axe longitudinal étant environ 20 fois plus grand que l'axe transversal. Une telle forme expliquerait, du moins pour une part, les propriétés mécaniques particulières du gluten.

On peut concevoir en outre que les chaînes polypeptidiques sont repliées sur elles-mêmes, impliquant à la molécule une structure hélicoïdale. C'est du moins ce que sembleraient montrer certaines observations récentes.

VERCOUTEREN et LONTIE (1954) ont signalé que la solution aqueuse obtenue après solubilisation du gluten par la diméthylformamide puis dialyse du solvant permettait l'obtention d'un film protéique par dessiccation sur une surface de mercure ; ce film, soluble dans l'eau, y devient insoluble si on l'étire après l'avoir mouillé. Par analogie avec certaines protéines animales, les auteurs suggèrent qu'il y aurait, dans ces conditions, transformation en β de la structure hélicoïdale α du gluten.

Si donc les notions que nous avons actuellement sur la structure des protéines du gluten appartiennent surtout au domaine de l'hypothèse, on doit constater que les Céréalistes tendent à faire un usage de plus en plus fréquent des méthodes physiques qui, dans d'autres domaines de la biochimie et dans le cas particulier de certaines protéines animales, ont permis le développement de nos connaissances sur la structure des molécules. Dans cet ordre d'idée, nous

citerons les analyses de Hess (1953 *b*) au microscope électronique visant à la différenciation des protéines et des lipides dans le gluten de la farine ; de même les études préliminaires aux Rayons X de Traub (1954) sur les protéines du blé, qui a publié les diagrammes obtenus à partir de gluten, de gliadine, et de gluténine.

C. — Dénaturation des protéines du blé

On a déjà eu l'occasion de mentionner l'action dénaturante des réactifs utilisés dans le fractionnement des protéines du blé ou de la farine et plus spécialement dans le cas des protéines constituantes du gluten. Il a été amplement montré que les solvants alcooliques et alcalins déterminent des modifications irréversibles des protéines extraites. On a vu encore que la dispersion des protéines du gluten par les acides dilués, même faibles, présentait certains risques de transformations hydrolytiques.

Il peut donc paraître pour le moins anormal qu'on ait préconisé, en remplacement de ces solvants fortement dénaturants, d'autres composés tels que l'urée et le salicylate qui, bien que de réaction neutre, sont réputés également posséder une action dénaturante marquée. En fait, contrairement à la plupart des protéines globulaires, les protéines du gluten semblent échapper à la dénaturation sous l'action de ces composés ; alors que l'hémoglobine par exemple est très rapidement dénaturée par le salicylate de Na, le gluten peut être dispersé et reprécipité de sa dispersion sans modification sensible de ses propriétés originales. Cette différence de comportement est vraisemblablement reliée à une différence de structure moléculaire. En effet l'addition d'urée ou de salicylate à un grand nombre de solutions protéiques augmente leur viscosité et provoque d'autres modifications indiquant que les molécules ont subi un allongement. Or une des actions possibles de ces dénaturants consiste en une rupture des ponts hydrogène. Si on admet que les molécules sont constituées d'une longue chaîne repliée sur elle-même et maintenue dans cet état par des liaisons hydrogène, on peut expliquer l'augmentation de viscosité des solutions protéiques traitées par l'urée ou le salicylate par un déploiement des chaînes polypeptidiques après rupture des ponts hydrogène.

Dans le cas particulier des protéines du gluten, l'addition d'urée s'accompagne également d'un accroissement de viscosité, indice que la structure moléculaire a subi un allongement. Mais le fait que le gluten peut être reprécipité sans altération apparente de ses propriétés indiquerait que les liaisons hydrogène, si elles existent, ou bien interviennent pour une faible part dans la structure moléculaire des protéines, ou bien sont capables de se reformer après avoir été rompues. L'allongement subi sous l'influence de l'urée ou du salicylate par les molécules protéiques du gluten supposées normalement asymétriques, ne modifierait donc pas sensiblement leur structure générale, contrairement aux molécules protéiques globulaires comme l'hémoglobine ou l'ovalbumine. Ainsi des différences de structure moléculaire pourraient-elles rendre compte des différences de comportement du gluten et des autres protéines vis-à-vis d'agents dénaturants tels que l'urée ou le salicylate.

Des divers facteurs susceptibles de provoquer la dénaturation des protéines du blé et de la farine, c'est principalement la chaleur qui a fait l'objet du plus grand nombre de travaux. Outre celle des agents chimiques utilisés dans l'isolement des protéines, certains travaux ont, à plusieurs reprises, signalé l'action dénaturante des composés réducteurs. Nous envisagerons donc successivement l'action dénaturante de la chaleur puis des réducteurs.

I. — Dénaturation par la chaleur

La plupart des observations rassemblées concernent les protéines insolubles. Récemment toutefois, LENARSKIJ (1951) a montré, dans le cas des protéines solubles du blé, que leur dénaturation par la chaleur pouvait être réversible. Le chauffage modéré des grains de blé a pour effet immédiat de diminuer le degré de solubilité des albumines et globulines, mais après un temps de latence de 90 à 100 jours, cette solubilité s'accroît de nouveau. Par contre, selon AUERMAN et coll. (1953), lorsque le grain de blé est séché à des températures élevées de l'ordre de 150°C on assiste à de profondes modifications des protéines solubles dans l'eau. Parallèlement la teneur en gluten et sa capacité d'hydratation diminuent fortement.

On a tout d'abord étudié l'action de la chaleur sur les protéines du blé, surtout afin de préciser cette action au cours du séchage artificiel des grains ou lors du traitement thermique des farines, en vue d'améliorer leurs qualités boulangères. GEDDES (1929) et (1930) a passé en revue la plupart des premiers travaux entrepris dans ce sens et a étudié lui-même les divers traitements pouvant être appliqués aux blés et aux farines sans altérer leurs qualités boulangères ; il concluait d'ailleurs que l'action de la chaleur sur les protéines est toujours néfaste.

On s'est également préoccupé de déterminer et de préciser l'action de la chaleur sur le gluten lui-même et ses protéines constituantes.

SHARP et GORTNER (1923) ont noté une diminution prononcée de la capacité d'hydratation du gluten après séchage à 45-50°C et ont mis en évidence que la fraction gluténine est beaucoup plus sensible à la chaleur que la fraction gliadine.

BLISH et SANDSTEDT (1926) constatent à leur tour que la déshydratation du gluten par exposition prolongée à 60-65°C dans un vide partiel détermine une dénaturation quasi-totale de la gluténine, sans action significative sur la gliadine. Par des mesures de viscosité et de solubilité sur des dispersions de gluten, COOK (1931) confirme cette labilité de la gluténine à la chaleur. Les observations de KRETOWITZ et RIAZANCEVA (1935) tendraient à montrer cependant que la gliadine est également sensible à un traitement thermique : le chauffage du blé à 130°C pendant 3 à 6 h détermine une diminution de 16 à 23 p. 100 de la fraction gliadine. Il convient de noter en outre que si la gluténine au contact de l'eau est très sensible à la chaleur, elle devient très résistante à la dénaturation thermique lorsqu'elle est dispersée en milieu acide. Les résultats récents présentés par SAGI (1953) semblent résumer les conceptions actuelles sur cette question : selon cet auteur, on peut séparer la gliadine de la gluténine à n'importe quelle température inférieure à 70°C et à des pH de 5 à 3, aussi bien à partir d'un gluten humide que d'un gluten préalablement séché puis réhydraté. L'hydratation réversible signifierait qu'il n'y a pas dénaturation de la gluténine, même aux températures voisines de 70°C, mais qu'il y a une modification légère et réversible de sa structure colloïdale. La moindre sensibilité à la chaleur de la gliadine semble être de nouveau démontrée par un récent travail de ORLAVA et coll. (1954) : après dénaturation thermique, la protéine peut être « régénérée » sous pression, ses propriétés étant alors différentes à la fois de la gliadine native et de la gliadine dénaturée.

En ce qui concerne plus particulièrement le gluten, OLCOTT et BLISH (1944) ont comparé l'action dénaturante de la chaleur dans diverses conditions ; l'ébullition dans l'eau ou le chauffage prolongé au-dessous 100°C le dénature ;

le gluten des produits de boulangerie est donc toujours dénaturé ; il est, bien entendu, rapidement dénaturé par séchage à pression ordinaire. Blish (1945) précise que le gluten séché rapidement dans le vide, sans être soumis aux températures élevées à l'état humide, ne perd pas sa capacité d'hydratation et peut être reconstitué sans modifications apparentes de ses propriétés physiques et colloïdales. A mesure que la température de séchage s'élève, il y a perte progressive de la capacité d'hydratation.

L'action de la chaleur sur les propriétés de protéines de la farine dans des conditions voisines de celles existant dans la pâte au cours de la panification a été peu étudiée. On doit à Pence, Mohammad et Mecham (1953) une étude récente concernant l'action de divers facteurs (température, temps de chauffage, pH, conditions d'hydratation) sur la vitesse d'altération des propriétés du gluten par la chaleur. Ils constatent que les vitesses de dénaturation à 80-90°C sont négligeables aux faibles teneurs en eau, mais s'élèvent rapidement à un maximum de 35-40 p. 100 d'humidité. La dénaturation est lente à pH 4, mais devient rapide aux pH élevés. Les relations entre pH, température, et vitesse de dénaturation sont extrêmement complexes. Des variations en concentration saline sont sans action sur la vitesse de dénaturation par la chaleur. Enfin, confirmant certaines observations antérieures, ils constatent que la dénaturation d'une préparation de gliadine est beaucoup plus lente que celle du gluten total.

2. — Dénaturation par les réducteurs

Balls et Hale (1936) ont, les premiers, observé que l'eau pure additionnée de cystéine dissolvait le gluten et signalé que des corps tels que le bisulfite et le cyanure provoquaient une dégradation immédiate du gluten s'accompagnant d'une libération de groupements —SH mis en évidence par la réaction au nitroprussiate.

Guillemet et coll. (1942) ont rapporté certaines observations concernant l'action de la cystéine et du cyanure sur le gluten ; lorsqu'on additionne l'alcool 70 p. 100 ou l'alcool 70 p. 100 potassé 0,3 p. 100 de cystéine ou de cyanure, la fraction de gluten dissoute passe dans le premier cas de 50 à 80 p. 100, dans le second de 65-70 à 90 p. 100 ; ils constatent en outre que la cystéine libère la majeure partie des lipides liés aux protéines du gluten.

Plus récemment, Pence et Olcott (1952) constatent que l'addition de monothioglycol à des dispersions alcooliques ou acétiques de gluten ou de gliadine traitées par la chaleur, détermine des modifications de viscosité. Des déterminations de poids moléculaire par pression osmotique et de la teneur en cystine, suggèrent que les molécules protéiques sont fragmentées par l'agent réducteur, ce qui explique la chute initiale de la viscosité. Ils admettent que les particules dénaturées s'associeraient alors par des liaisons hydrogène, probablement par l'intermédiaire de leurs groupements —SH.

Udy (1953) étudie l'influence du bisulfite de Na et de l'acide thioglycolique sur la viscosité de dispersion de gluten dans l'acide acétique dilué ou dans le salicylate de Na 8 p. 100. Lorsque la dispersion est faite dans le salicylate, la force ionique élevée du milieu aurait pour effet de diminuer les forces électrostatiques d'interaction entre les molécules protéiques ; l'addition du réducteur provoquerait la rupture des liaisons disulfure en même temps qu'une diminution des forces électrostatiques. L'auteur considère que les différences de viscosité des glutens dispersés sont étroitement liées aux forces électrostatiques du gluten natif.

De Deken, Mortier et Wiame (1953) ont, dans une étude récente sur la solubilité du gluten, fait appel à divers réducteurs tels que : sulfure de Na, cyanure, cystéine, thioglycolate et acide ascorbique. Alors que l'eau pure dissout des quantités très variables de gluten (3 à 50 p. 100) par agitation mécanique violente, le gluten est rapidement et totalement solubilisé dans des solutions réductrices M/100 à pH 11 par action mécanique ménagée. Après reprécipitation de leur solution les protéines réduites ont perdu leurs propriétés initiales. Le comportement du gluten vis-à-vis des agents réducteurs, mettrait en évidence le rôle essentiel des groupements —S—S— dans les propriétés mécaniques et expliquerait l'action bénéfique des agents oxydants lors du traitement des farines.

S'il apparaît que l'action dénaturante des agents réducteurs se traduit par une fragmentation des molécules protéiques avec libération probable de groupements —SH, certaines constatations expérimentales récentes laisseraient entendre que les particules dénaturées auraient la faculté de se réassocier entre elles.

Il semble d'autre part que la libération de groupements réducteurs lors de la dénaturation soit un phénomène général, quelle que soit la nature de l'agent dénaturant. En effet, après action du chlorhydrate de guanidine sur le gluten, Baker, Parker et Mize (1944) ont décelé la présence de substance réductrices sans préciser toutefois s'il s'agissait de groupements —SH. Myers et Working (1944), qui n'ont pu mettre en évidence la présence de —SH dans le gluten intact, sont d'avis que la libération de tels groupements ne peut s'effectuer qu'à la suite d'une dénaturation des protéines.

D. — Homogénéité ou hétérogénéité des protéines

Les diverses méthodes de fractionnement utilisées ont-elles conduit à l'obtention d'« entités biochimiques » définies et le gluten isolé par pétrissage de la farine sous l'eau peut-il être considéré comme formé des deux protéines classiques gliadine et gluténine ?

Nous allons essayer de dégager des très nombreux résultats expérimentaux et des diverses hypothèses émises à ce sujet, l'état actuel de nos connaissances dans ce domaine, en examinant successivement les protéines « solubles » du grain, les protéines « insolubles » du gluten et le complexe protéique que constitue le gluten lui-même.

1. — Protéines « solubles »

La classification des protéines « solubles » du blé en albumine et globuline a été à l'origine fondée sur les caractéristiques de solubilité. Nous avons vu que de très nombreux essais ont été entrepris pour les isoler et déterminer leurs quantités relatives. Il est apparu en outre que de tels critères demeuraient insuffisants puisqu'on n'obtenait pas de séparations vraiment nettes et que les résultats variaient selon la nature et la concentration des solutions salines utilisées pour l'extraction.

C'est ainsi qu'Hoffman et Gortner (1927) ont isolé de la farine deux albumines et deux globulines se différenciant par leur solubilité. La globuline A extraite par SO_4K_2 et NaCl 10 p. 100, la globuline B soluble dans NaCl 10 p. 100 seulement, et les albumines A et B ayant un comportement identique. Un tra-

vail ultérieur de BRANDT et KOSSEL (1942) est venu, semble-t-il confirmer ces premières observations en mettant en évidence la présence de plusieurs composants protéiques dans les extraits aqueux de farine.

L'hétérogénéité des albumines se dégage également des résultats publiés par LAWS et FRANCE (1948) qui ont, au cours d'une étude électrophorétique, mis en évidence plusieurs constituants dans les extraits aqueux de farine.

Par examen d'extraits salins de farine à l'ultracentrifugation, SAVERBORN et coll. (1944) puis DANIELSSON (1949) ont trouvé que le blé contient deux globulines distinctes α et γ.

PENCE, ELDER et MECHAM (1951) ont tenté un fractionnement des protéines de la farine solubles dans un tampon phosphate pH 6,8 ; par dialyse de l'extrait ainsi obtenu, ils ont pu séparer trois fractions protéiques distinctes se répartissant comme suit :

— fraction dialysable : contenant des composés azotés de faible poids moléculaire ;

— fraction non dialysable constituée :

a) d'une albumine brute soluble dans l'eau ;

b) d'une fraction protéique insoluble dans l'eau qui serait un mélange de globuline, d'albumine dénaturée et de gliadine.

Tout récemment, PENCE et ELDER (1953) par des examens électrophorétiques, par l'ultracentrifugation, pression osmotique et déterminations chimiques ont établi certaines propriétés physico-chimiques d'échantillons purifiés d'albumines et globulines. Les albumines ont été extraites de la farine par un tampon phosphate, puis séparées des gliadines et des pentosanes par fractionnement au $SO_4(NH_4)_2$. Les globulines ont été extraites par ClNa M/1 et purifiées par précipitation fractionnée au $SO_4(NH_4)_2$, puis dialyse.

En faisant reposer ainsi les critères d'identification sur plusieurs propriétés physiques et chimiques caractéristiques, on a pu montrer l'existence de trois globulines et de six albumines, ces dernières de taille moléculaire identique mais de propriétés électrophorétiques différentes.

Les trois globulines désignées respectivement par α, β et γ ont été identifiées dans des préparations à partir de farine ou de germe délipidé.

PENCE et ELDER ont noté en outre la présence d'un composant de poids moléculaire élevé qui correspondrait au constituant δ trouvé dans l'orge par QUENSEL (1942) mais que DANIELSON (1949) a montré ne pas être présent dans le blé. L'embryon serait particulièrement riche en composé γ, l'endosperme contiendrait à la fois les α et γ globulines. Le son contiendrait davantage de γ que d'α globuline.

Dans une publication ultérieure, PENCE et coll. (1954 *a*) ont indiqué les proportions respectives des α, γ, et δ globulines dans le germe et la farine, estimées par mesure des surfaces des diagrammes de sédimentation. Voici les valeurs moyennes :

	α	γ	δ
Globulines			
Germe	14	67	15
Farine	44	46	7

Cette étude des protéines solubles du blé vient d'être complétée par l'intéressant travail de PENCE (1953 *a* et *b*). Par électrophorèse sur papier, on a pu mettre en évidence 11 constituants apparemment individuels de la fraction albumine de la farine de blé pouvant être, d'après leur migration à divers pH, répartis en 3 groupes α, β, et γ.

Le groupe α comprend la majorité des composants et le groupe γ la minorité.

Les composants du groupe α semblent s'apparenter plus étroitement l'un à l'autre que ceux des deux autres groupes. Le groupe γ semble le moins homogène. Les quantités relatives des divers composants varient selon les farines.

PENCE, WEINSTEIN et MECHAM (1954 *c*) ont en outre constaté que les albumines extraites de farine de blés durs sont en proportions quantitatives différentes de celles en provenance des blés ordinaires. Les électrophérogrammes sur papier montrent que les blés durs contiennent de fortes quantités du groupe α et seulement de faibles quantités des albumines β et γ. Dans les blés ordinaires, le groupe le plus important est celui des β albumines. Les différences observées ne semblent pas être conditionnées par le lieu de culture ou l'année de récolte. Contrairement aux blés durs, la composition des blés ordinaires en albumines ne présente pas de différences très marquées.

2. — **Protéines « insolubles »**

Gliadine

Les résultats obtenus par WOODMAN (1922), BLISH et PINKNEY (1924) concluaient à l'identité des protéines isolées. Des études ultérieures ont mis en doute l'homogénéité moléculaire des préparations de gliadine. Les cinq préparations de gliadine obtenues par COOK (1931) à l'aide de diverses techniques, différaient entre elles par leurs propriétés de solubilité et de viscosité.

HAUGAARD et JOHNSON (1930) ont constaté également des différences de viscosité et d'activité optique entre les diverses fractions obtenues par fractionnement thermique de la gliadine et concluent à l'hétérogénéité de la protéine. SINCLAIR et GORTNER (1933) ne purent confirmer cependant certaines différences de composition chimique mentionnées par HAUGAARD et JOHNSON. KUHLMAN (1937) constate que les fractions protéiques extraites par l'éthanol 40 p. 100 et l'éthanol 70 p. 100 ont des propriétés d'hydratation et de gonflement différentes ; il en conclut que la gliadine n'est pas une protéine individuelle mais un complexe formé de deux fractions : l'α gliadine, représentant la masse principale de la gliadine d'OSBORNE et la β gliadine dont les propriétés de gonflement et de dispersion la rendent voisine de la gluténine.

L'étude des diverses préparations de gliadine à l'aide des méthodes modernes faisant intervenir des tests physiques, devait à son tour et dans tous les cas, conclure à l'hétérogénéité. Les études de KREJCI et SVEDBERG à l'ultracentrifuge (1935) ont mis en évidence que la gliadine en solution était à l'état de molécules entières et de demi-molécules, la dissociation en demi-molécules augmentant avec la température. LANN et POLSON (1936) observent que les constantes de diffusion de plusieurs fractions sont différentes et admettent l'hétérogénéité de la gliadine. BURK (1938) parvient à une conclusion identique à partir de déterminations de poids moléculaire par mesures de pression osmotique dans divers solvants organiques.

La technique d'électrophorèse de TISELIUS appliquée à des préparations de gliadine a conduit MCCALLA et GRALEN (1942), PUTNAM, BRIGGS et GORTNER (1942), SCHWERT, PUTNAM et BRIGGS (1944) à considérer la fraction prolamine du blé comme électrophorétiquement hétérogène. Des conclusions identiques se dégagent des observations expérimentales plus récentes rapportées successivement par FIDANZA et coll. (1952), KONDO et coll. (1952) et MILLS (1954).

Gluténine

Se basant sur les modifications du pouvoir rotatoire de protéines isolées selon la technique d'OSBORNE et purifiées par redissolutions et reprécipitations successives, WOODMAN (1922) conclut que les gliadines sont identiques d'une farine à l'autre alors que les gluténines sont différentes et postule ainsi l'existence d'au moins deux gluténines chimiquement différentes. SHARP et GORTNER (1923) du point de vue comportement colloïdal considèrent également qu'il existe deux gluténines différentes. Pour étayer les vues de WOODMAN, HALTON (1924) a essayé de montrer que la gluténine pouvait être séparée en deux fractions par précipitation chlorhydrique d'une dispersion alcaline de la protéine. Cependant BLISH et PINCKNEY (1924) puis KENT-JONES (1926) n'ont pu confirmer les vues de WOODMAN. Un peu plus tard CSONKA et JONES (1927) ont préparé à partir du gluten deux gluténines α et β.

Les résultats plus récents d'OLCOTT et MECHAM (1947) semblent apporter des précisions d'une nature nouvelle sur la complexité de la fraction gluténine. Des études de fractionnement du gluten ont montré que la majeure partie des lipides est associée à la gluténine. Les auteurs ont obtenu des fractions gluténine contenant jusqu'à 20 p. 100 de lipides. Selon eux, telle qu'elle se présente dans le gluten, mais non nécessairement dans le grain de blé, la gluténine doit être considérée non pas comme une protéine mais comme une lipoprotéine. La plupart des difficultés rencontrées dans l'isolement et l'identification des protéines constituantes du gluten devraient, selon OLCOTT et MECHAM, être attribuées à l'ignorance de la nature lipoprotéique de la gluténine. Si, en effet, de nombreux chercheurs s'accordent sur les propriétés de la gliadine, non liée aux lipides (LARMOUR et SALLANS (1932), BLISH (1945)), peu s'accordent sur celles de la gluténine. OLCOTT et MECHAM pensent que l'existence de la gluténine, en tant qu'entité protéique, est discutable et qu'il vaudrait mieux la désigner par fraction non gliadine du gluten de blé. La nature lipidoprotéique de la gluténine semble avoir été entrevue par GUILLEMET et coll. (1942) : ces auteurs ont en effet rapporté qu'en traitant du gluten à froid par l'alcool potassé 3 p. 100 la fraction gluténine s'enrichit en lipides liés ; ils admettent que l'alcool 70 p. 100 dissout de préférence les protéines auxquelles ne sont pas liés les lipides.

3. — **Le gluten**

Dès 1895 O'BRIEN, considérant les proportions extrêmement variées de gliadine qui pouvaient être extraites de la farine à l'aide de méthodes différentes, faisait observer que l'on pouvait concevoir l'une des protéines du gluten comme dérivant de l'autre. Il suggérait l'existence dans la farine d'une protéine originelle donnant naissance au gluten après hydratation. KOSUTANY (1907) admettait également une interconversion des deux protéines en supposant que la gliadine pouvait être considérée comme un hydrate de gluténine, et la gluténine comme un anhydride oxydé de la gliadine.

Les recherches d'OSBORNE devaient toutefois établir que le gluten était formé de deux protéines distinctes. Une telle conception, admise d'abord de façon quasi unanime, devint moins évidente lorsqu'on se rendit compte qu'un grand nombre de facteurs étaient susceptibles de modifier la nature et la quantité des protéines au cours de l'isolement, et que les caractéristiques de solubilité sur lesquelles OSBORNE avait fondé sa classification, n'avaient rien d'absolu.

Aussi, avec le développement des moyens d'investigation et l'accumulation des faits expérimentaux, s'est-on écarté progressivement de la conception d'Osborne voyant dans le gluten un simple mélange de 2 protéines individuelles. A la lumière des études les plus récentes, les chercheurs sont unanimes à reconnaître l'hétérogénéité du gluten. Les avis demeurent cependant partagés sur la nature même de cette hétérogénéité.

— Certains auteurs considèrent le gluten comme un complexe protéique constitué de quelques protéines distinctes, relativement peu nombreuses.

— D'autres au contraire l'assimilent à un complexe protéique unique pouvant être séparé en un très grand nombre de fractions distinctes.

Nous allons voir sur quels arguments s'appuie chacune de ces conceptions.

a) Le gluten : système protéique a plusieurs constituants

A partir d'une dispersion de gluten dans un mélange éthanol-acide acétique, Sandstedt et Blish (1933) séparent 3 groupes protéiques distincts. Le 1er, insoluble dans l'alcool dilué, désigné par groupe *gluténine*, constitue environ le 1/4 du gluten ; le 2e, groupe *gliadine* soluble dans l'alcool 50 à 70 p. 100 représente environ la moitié du gluten ; le 3e groupe enfin, assez peu soluble dans l'alcool neutre, est dispersé dans l'alcool dilué en présence d'acide acétique ; il représente l'autre 1/4 du gluten et est appelé *mésonine* du fait qu'il constitue une fraction intermédiaire. Blish (1936) et (1937) devait d'ailleurs passer en revue les diverses méthodes de séparation faisant intervenir la précipitation fractionnée à partir de dispersions de gluten dans des solvants divers et montrer que les résultats obtenus étaient en faveur de l'hétérogénéité des fractions gliadine et gluténine d'Osborne. L'emploi de 2 techniques de fractionnement, dont l'une faisait intervenir l'action de la température, a permis à Harris et Bailey (1937) d'isoler à partir de dispersion de gluten 3 groupes protéiques type gluténine, mésonine et gliadine. Stockelbach et Bailey (1938) employant une technique légèrement différente de celle de Sandstedt et Blish ont obtenu également 3 fractions distinctes, la fraction mésonine étant, de par sa composition en acides aminés, plus proche de la gliadine que de la gluténine. A partir de dispersion de gluten dans le salicylate de Na, Harris (1937 et 1938) a séparé diverses fractions protéiques par additions successives de SO_4Mg. Par précipitation différentielle à partir de divers solvants, Brother et Olcott (1947) ont de même fractionné le gluten en plusieurs constituants ; selon eux, gluténine et gliadine seraient les constituants principaux du gluten, mais chacune serait constituée de plus d'une protéine. En fractionnant une dispersion lactique de gluten par neutralisation progressive par $Ca(OH)_2$, Harris et Frokjer (1952) ont obtenu 3 fractions distinctes, l'une à pH 5, l'autre entre pH 5 et 5,5, la 3e au-dessus de pH 5,5.

Enfin, ainsi que l'ont signalé Lontie, Crèvecoeur et Dulcino (1954) l'électrophorèse selon Tiselius des protéines du gluten dans un tampon lactate 0,0015 M en présence de 0,1 p. 100 de 2-mercapto-éthanol indique la présence d'au moins 3 constituants principaux et de 2 composants secondaires.

Parallèlement à ces observations, reposant sur l'obtention de groupes protéiques distincts lors de la précipitation fractionnée de dispersion de gluten, certains auteurs ont apporté des arguments fondés sur l'interprétation des propriétés physiques des fractions isolées.

Les importants travaux de Bunjenberg de Jong et Klaar (1929, 1930, 1931 et 1932) ont montré que l'interaction entre les 2 protéines constituantes

du gluten est susceptible de déterminer la formation de complexes, en raison des différences dans les charges électriques des particules protéiques. La nature et le degré d'interaction varie avec le pH et la concentration de chaque protéine, l'interaction maximum se produisant dans la zone intermédiaire des points isoélectriques des protéines, lorsque la gliadine présente une charge positive et la gluténine une charge négative. La formation et la stabilité du gluten seraient conditionnées par la formation de ces complexes. De Jong (1933) a discuté les propriétés des mélanges gliadine gluténine et résume les travaux entrepris et fondés sur des mesures de viscosité de turbidité et des critères d'hydratation et de coagulation. Selon lui les constituants protéiques du gluten sont relativement peu nombreux ; mais il convient de considérer le gluten comme autre chose qu'un simple mélange de gliadine et gluténine. L'interaction entre les composants ou la formation de complexes constituent des facteurs compliqués rendant toute interprétation rationnelle des résultats extrêmement difficile.

En s'appuyant sur certaines propriétés physiques de fractions gliadine isolées, Kuhlmann (1937) considère que le gluten représente un complexe protéique formé de micelles de longueurs différentes, les plus longues et les plus stables étant celles de la gluténine.

b) Le gluten : complexe protéique unique

Au cours de leurs études de dispersion du gluten dans les solvants neutres McCalla et Rose (1935) constatent la continuité et la régularité des courbes exprimant les pourcentages de gluten dispersé en fonction de la concentration en salicylate ; ils émettent alors l'hypothèse selon laquelle « la majeure partie du gluten est formée d'un complexe protéique unique pouvant être séparé en un grand nombre de fractions différant de façon progressive et systématique dans leurs propriétés physiques et chimiques ». Spencer et McCalla (1938) confirment ces observations et émettent la même hypothèse.

La même idée est reprise par Rich (1938) à partir de considérations d'un autre ordre. Tenant compte du fait que les résultats d'analyse des protéines constituantes du blé varient dans des proportions considérables selon la méthode d'extraction, il considère que le gluten est un complexe protéique unique et que les divers solvants utilisés au cours de l'extraction et de l'isolement ont pour effet de diviser ce complexe protéique en fractions de composition et de taille variables.

A partir d'une dispersion de gluten dans l'acide acétique dilué, Blish (1936) est parvenu effectivement, par addition ménagée de sels ,à isoler un nombre important de fractions protéiques, les quantités précipitées étant fonction du pH, de la quantité de sel, de la concentration en protéine et du temps.

Les résultats de Guillemet, Sonntag et Guilbot (1942) vont eux aussi à l'encontre de la conception du gluten formé de quelques protéines distinctes. Etudiant le gonflement du gluten ou de ses constituants sous l'action d'acides dilués, ils notent que les courbes de gonflement en fonction du pH ne font pas apparaître de points singuliers : tout se passe, selon eux, comme si le gonflement s'appliquait à une substance unique.

Par des méthodes d'ultracentrifugation et de diffusion McCalla et Gralen (1942) déterminent les caractéristiques moléculaires du gluten dispersé dans le salicylate. A mesure qu'augmente la concentration en salicylate, il y a accroissement correspondant des protéines moléculairement dispersées et

toutes les fractions obtenues contiennent des agrégats moléculaires de tailles diverses. Les auteurs en concluent que le gluten est un système protéique formé d'un très grand nombre de constituants dont les propriétés physiques varient progressivement et que la conception considérant le gluten comme formé de 2 ou même 3 ou 4 constituants protéiques individuels est incompatible avec leurs résultats expérimentaux.

Plus récemment, BARMORE (1947) en s'appuyant sur les propriétés de viscosité de diverses fractions du gluten, a montré que les fractions protéiques communément appelées gliadine et gluténine font partie d'un système protéique complexe tel qu'il a été défini par McCALLA. Les molécules de la fraction dite « gliadine » semblent être les plus solubles et les plus symétriques ; les molécules de « gluténine », de symétrie également variable, sont moins symétriques que celles de « gliadine ». Il semble que la solubilité de la molécule est d'autant plus grande que sa symétrie est elle-même plus grande.

Autre argument, enfin, à cette hypothèse faisant du gluten un complexe protéique unique : COLVIN et McCALLA (1949) ont montré que les dispersions de gluten dans le salicylate, soumises à l'électrophorèse, se révèlent homogènes.

Quelles sont alors les conclusions pouvant être dégagées de ces 2 courants d'opinion et des faits expérimentaux qui les étayent ?

— Il n'est actuellement plus possible de considérer le gluten comme un simple mélange des 2 protéines individuelles classiques gliadine et gluténine ainsi que l'admettait OSBORNE.

— Les diverses préparations protéiques obtenues par les méthodes de fractionnement faisant intervenir les caractères de solubilité et de dispersion du gluten ne constituent probablement pas des individualités chimiques définies.

— Dans l'état actuel de nos connaissances, il n'est pas possible de préciser si l'hétérogénéité du gluten résulte d'un nombre limité de protéines distinctes ou de l'association d'un très grand nombre de constituants protéiques. Certains toutefois, considèrent que cette hétérogénéité pourrait être déterminée par l'interaction d'un petit nombre de composants plutôt que par l'existence de nombreux composants individuels.

— Les caractères de solubilité ou de dispersion du gluten sont extrêmement complexes et l'application des méthodes physiques modernes à l'étude des propriétés moléculaires est d'une interprétation très difficile.

— Pour qu'il soit possible d'apporter une solution au problème de l'hétérogénéité du gluten et de sa structure, il sera sans doute nécessaire d'envisager l'emploi de nouveaux solvants mieux appropriés, ou l'adoption de nouveaux critères et de nouvelles méthodes d'investigation.

IV. — LES ACIDES AMINÉS DU BLÉ

Méthodes d'analyse

a) HYDROLYSE

Pour obtenir des rendements élevés en acides aminés à partir des protéines isolées, OSBORNE utilisa comparativement un grand nombre de méthodes d'hydrolyse portant sur des quantités importantes de protéines : il hydrolysait par exemple 1 kg de protéine par 2 l d'HCl 50 p. 100 à l'ébullition pendant

Composition en acides aminés du grain, de la farine, du germe et du son

	Grain total														Farine						Germe						Son	
	P. 100 des Protides (avec N = 16 %)									Écart % p. rapt. prot. œuf	P. 100 de subst. sèche				Acides aminés libres (mg p. 100 g)	P. 100 des Protides				Écart % p. rapt. prot. œuf	P. 100 de substance sèche	P. 100 des Protides (avec N = 16 %)				Écart % p. rapt. prot. œuf	P. 100 de substance sèche	P. 100 des Protides	P. 100 de subst. sèche
																	Endosperme											
																	int.	ext.										
Arginine	2,8	4,2	4,2	3,8	—	4,5	4,5	—	4,33-4,78	— 34	0,5	—	—	—	—	3,9	3,1	2,9	4,5	— 39	0,4	6	6	6,2	6,9	— 6	—	7,5	0,9
Ac. aspartique	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,59-0,61	0,1-0,6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Cystine-cystéine....	1,3	1,8	—	1,7	3,1 (1)	—	—	—	—	— 25	—	—	—	0,40-0,42	—	1,9	(17) 2,2-4,5	1,5	1,9	— 21	(17) 0,21-0,47	0,6	0,8	1,4	—	— 67	—	1,5	—
Ac. glutamique ..	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3,9	—	—	0,453-0,498 (+ alanine)	0,4-2,6 (+ alanine)	—	—	—	—	—	3,8	—	—	—	—	—	—	—	—
Glycine	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,58-0,61	7,2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Histidine	1 à 2	2,1	2	1,6	1,4	2	2	1,50	1,74-1,96	—	0,4	0,39	0,174	0,51-0,63	—	2,2	1,5	1,6	1,7	+ 5	0,3	2,5	2,5	3	2,1	+ 19	0,84	1,7	0,5
Isoleucine.....	3,3	3,6	3,6	7	3,8	3,6	3,1	3,50	3,64-3,96	— 55	0,7	0,68 / 0,63 (2)	0,405	1,48	— / 0,1-0,6	3,7	3,7	7	6,6	— 54	0,7	3	2,9	5,2	3,4 (13)	— 62	1,48	4,5	0,8
Leucine.....	5,8	6,8	6,8	8,3	5,6	6,8	6,2	6,54	5,70-6,34	— 26	1	1,13 / 1,11 (2) / 1,18(12)	0,756			12	7,5	9,1	8	— 18	1	7,4	6,7	7,3	5,2 (13) / 6	— 27	2,03 (11) / 2,44	6,5	1,1
Lysine.....	2,7	2,7	2,9	2,8	2,4	2,5	2,5	2,2	2,31-2,42	— 63	0,4	0,48	0,254	0,50-0,54	—	1,9	2,2	1,9	2,6	— 72	0,3	5,5	5,5	5,4	6,8	—24	2,52	3,9	0,6
Méthionine....	—	2,5	1,2	1,3	—	1	1,2	1,2	1,12-1,44	— 39	0,2	0,21	0,138	—	—	3	1	1,1	1,4	— 63	0,1	2	2	1,3	—	— 51	0,51	1,1	0,2
Phénylalanine	5,7	5,7	5,1	3,7	4,4	3,8	4,8	5,3	4,46-4,65	— 10	0,7	—	0,61	0,61-0,68	0,2-0,8	5,5	5,6	3,9	3,4	— 13	0,7	4,2	4,2	2,5	3,3 (13) / 3,5	— 33	—	2,4	0,6
Proline	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,45	0,1-0,4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sérine	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,7	—	—	0,58-0,68	0,1-0,4	—	—	—	—	—	0,6	—	—	—	—	—	—	—	1
Thréonine....	3,3	3,3	2,5	2,8	—	3	2,8	—	2,54-2,84	— 33	0,4	0,57	—	0,39	0,1-0,3	2,7	2,5	2,6	2,7	— 45	0,3	3,8	3,8	6,3	4	— 22	1,63	2,8	0,4
Tryptophane .	1	1,2	1,4	1	0,97 (6) / 1,16 (3)	1,4	1,35	1,08	—	— 20	0,2	—	0,124	—	—	0,8	1	0,9	1,1	— 33	0,1	1	1	0,9	—	— 33	—	1,8	0,3
Tyrosine	3,8	4,4	—	—	—	—	—	—	—	— 2	0,1	—	—	0,29-0,32 (+ méthionine)	0,1-0,2	3,8	—	—	—	— 16	0,2	3,8	3,8	—	—	— 6	—	—	0,2
Valine	3,6	4,5	4,5	4	4,8	4,1	4,3	3,99	3,79-4,43	— 38	0,7	0,79 (2) / 0,68	0,461	0,68-0,73	0,1-0,5	3,4	4,2	3,6	4	— 42	0,6	4,1	4,1	4,2	5,1 (13) / 4,8	— 44	1,96	4,1	0,9
Auteurs	4	10	5	8	13	14	15 selon KUHNAU (1950)	18	20	9	7	16	18	19	19	4	10	8	8	9	7	4	10	8	16 selon KUHNAU (1950)	9	16	8	7

1. GUBLER et GRAVES (1942). — 2. KUICKEN et Coll. (1943). — 3. GREENE et BLACK (1944). — 4. BLOCK et BOLLING (1945). — 5. STOKES et Coll. (1945). — 6. WOOLEY et SCHRELL (1945). — 7. BAUMGARTEN et Coll. (1946). — 8. BARTON-WRIGHT et MORAN (1946). — 9. MITCHELL et BLOCK (1946). — 10. BLOCK et MITCHELL (1946-47). — 11. HODSON et KRUEGER (1947). — 12. RIESEN et Coll. (1946). — 13. SCHWEIGERT (1947-48). — 14. JONES et Coll. (1948). — 15. MCELROY et Coll. (1949). — 16. HORN, JONES et BLUM (1946 à 49). — 17. WOSTMAN (1950). — 18. BALASUBRAMANIAN et Coll. (1952). — 19. MOYER et WHITEHEAD (1952). — 20. RENNER, BENTLEY et MCELROY (1953).

9 à 10 h. Les méthodes d'analyse alors en usage nécessitaient en effet de fortes quantités d'acides aminés.

Les bilans obtenus étaient assez faibles et représentaient 50 à 60 p. 100 de l'azote total des protéines hydrolysées. On a bien entendu cherché à améliorer les méthodes d'hydrolyse, et les travaux effectués après OSBORNE dans le domaine particulier des protéines des céréales ont bénéficié des perfectionnements apportés aux techniques générales d'analyse des protéines. CASARES (1951) a récemment passé en revue les méthodes usuelles d'hydrolyse pratiquées dans le cas des protéines du blé. Bien que les bilans obtenus soient beaucoup plus élevés qu'à l'origine, les conditions d'hydrolyse ne permettent pas d'éviter de façon totale certaines erreurs inhérentes à la méthode elle-même. LUSENA (1950 *a*) a signalé la formation de substances humiques au cours de l'hydrolyse du gluten par réaction du tryptophane avec les glucides. Il a étudié l'influence du rapport acide/protéines et de la présence d'impuretés (amidon, lipides) sur la formation de matières humiques au cours de l'hydrolyse ; il a constaté que la quantité de substances humiques formées semble être d'autant plus faible que le rapport acide/protéine est plus élevé.

b) DÉTERMINATION QUANTITATIVE DES ACIDES AMINÉS

Outre les 3 types de techniques analytiques utilisés couramment dans l'étude des produits d'hydrolyse des protéines (estérification de FISHER, nombre d'HAUSSMAN, méthode de VAN SLYKE) plusieurs méthodes spécifiques de dosage de certains acides aminés ou de groupes d'acides aminés ont été appliquées par OSBORNE à l'étude des protéines du blé et de la farine. Le principe de telles méthodes a prévalu pendant plusieurs décades. Le développement des méthodes colorimétriques de dosage des acides aminés, puis des méthodes microbiologiques a apporté une amélioration importante des techniques d'analyse permettant de préciser les proportions relatives des acides aminés constituants du blé. De telles méthodes, en particulier celles faisant intervenir les besoins nutritionnels de microorganismes, ne peuvent être considérées comme parfaites et, pour être valables, les essais nécessitent souvent un nombre important de dosages. Néanmoins elles demeurent suffisamment précises pour permettre des comparaisons de composition entre diverses protéines et les protéines de diverses céréales.

Une place de plus en plus grande est réservée actuellement aux techniques analytiques de nature physico-chimique. On a proposé récemment des dosages polarographiques de la cystine des farines : WOSTMANN (1950) et LASAFFRE (1953). D'autre part il semble que la pratique des techniques chromatographiques l'emporte actuellement sur celle des méthodes microbiologiques.

Nous étudierons successivement la composition en acides aminés du grain de blé et de ses constituants, puis celle des diverses fractions protéiques qui ont été isolées.

I. — Acides aminés du grain de blé et de ses constituants

En 1945, BLOCK et BOLLING, puis BLOCK et MITCHELL (1946-47) ont regroupé les très nombreux résultats analytiques publiés au cours de plusieurs décades et en ont dégagé les valeurs moyennes exprimant la composition du grain de blé de la farine et du germe en une douzaine d'acides aminés. De nombreuses techniques d'analyse, pour la plupart chimiques, avaient été mises en

œuvre par les auteurs. Parallèlement aux valeurs rapportées par BLOCK et coll., nous avons rassemblé en un tableau les résultats analytiques obtenus au cours des 8 à 10 dernières années, à l'aide des méthodes modernes d'analyse. Sur le même tableau ont été rapportées des valeurs dues à MITCHELL et BLOCK (1946) qui expriment, en p. 100, les différences de composition entre le grain, la farine ou le germe et les protéines totales de l'œuf considérées comme protéines-type. Elles mettent en évidence l'acide aminé limitant pour chacun des produits examinés : la lysine pour le grain total et la farine, l'isoleucine dans le cas du germe.

La première étude complète sur la composition du grain et de ses constituants en acides aminés a été présentée en 1946 par BARTON-WRIGHT et MORAN. A l'aide des méthodes microbiologiques d'analyse, ces auteurs ont déterminé la répartition de 11 acides aminés essentiels dans les diverses régions anatomiques du grain : germe, son et endosperme, ce dernier réparti lui-même en 2 fractions distinctes ; l'endosperme « interne » correspond à une farine extraite à 70 p. 100 et l'endosperme « externe » représente la portion voisine de la couche d'aleurone.

Les résultats de BARTON-WRIGHT et MORAN (1946) font ressortir que la concentration la plus élevée en acides aminés se trouve, à l'exception du germe, dans les parties périphériques du grain, et qu'il y a accroissement progressif de cette concentration du centre vers la périphérie. A l'exception de l'arginine, lysine et tryptophane, la concentration des acides aminés dans le son demeure toutefois plus faible que dans l'endosperme externe par suite de la nature fibreuse du péricarpe.

Le germe de blé, de même que les parties périphériques, présente par rapport au reste du grain, une composition singulière : ses protéines ont une teneur en isoleucine et cystine plus faible, mais sont deux fois plus riches en lysine.

Une étude des protéines du son avait déjà permis à JONES et GERSDORFF (1923-25) de constater des teneurs en arginine, lysine et tryptophane plus élevées dans le son que dans l'endosperme du grain. L'analyse de fractions protéiques isolées par CSONKA (1937 *a* et *b*) à partir de farine blanche et de farine de mouture intégrale, avait mis en évidence que le son présente, par rapport à la farine blanche, une teneur plus élevée en histidine, arginine, lysine et tyrosine, mais une teneur en cystine et tryptophane légèrement inférieure. Ces observations devaient être ultérieurement précisées par les travaux de STOKES, GUNNESS, DWYER et CASWELL (1945) et de BARTON-WRIGHT et MORAN (1946). Un travail de GUILLEMET et COLINEAU (1945) a montré que les protéines périphériques du grain de blé constituantes de l'assise protéique et de la bande hyaline contiennent plus de 30 p. 100 de leur azote sous forme d'acides diaminés.

Selon BARTON-WRIGHT et MORAN (1946) les valeurs concernant la méthionine, obtenues par les méthodes chimiques, seraient trop élevées et par contre, celles concernant l'isoleucine et la leucine, trop faibles. D'une façon générale, et dans ce cas particulier, la détermination des acides aminés par méthode chimique rencontre certaines difficultés que permettent d'éviter les méthodes microbiologiques.

Nous avons rapporté parallèlement les résultats plus récents de BALASUBRAMANIAN et coll. (1952) et de RENNER et coll. (1953), obtenus également à l'aide des méthodes microbiologiques. Les valeurs publiées par ces derniers auteurs concernent des grains ayant subi différents modes de culture au cours de 4 années consécutives.

La mise en œuvre relativement récente des techniques chromatographiques a contribué d'autre part à préciser nos connaissances sur la composition qualitative et quantitative du grain de blé en acides aminés. La chromatographie sur papier a été utilisée par DAS et BISWAS (1953) et KUDRJASHOVA et coll. (1953) pour l'identification des principaux acides aminés du grain. MORRIES et STUCKEY (1953) ont proposé une détermination quantitative de l'acide glutamique du blé et du gluten (à ± 12 p. 100) en combinant la chromatographie sur résine et sur papier. Les résultats les plus récents dans ce domaine nous ont été fournis par MOYER et WHITEHEAD (1952) qui ont déterminé la composition quantitative du blé en acides aminés en faisant appel à la chromatographie de partage sur colonne d'amidon.

2. — Les acides aminés et les peptides libres

a) Acides aminés libres du blé et de la farine

On a depuis longtemps constaté que les extraits aqueux de farine contenaient en même temps que des protéines type albumine, une certaine fraction d'azote aminé libre, mais on s'était contenté de doser globalement cette forme libre de l'azote. Pour la première fois, SULLIVAN et PAYNE (1951) ont identifié, par chromatographie sur papier, et individuellement, les divers acides aminés présents dans un extrait aqueux de farine. En même temps que l'asparagine et la glutamine, ils ont pu mettre en évidence les acides aminés suivants : alanine, arginine, acide aspartique, acide glutamique, glycine, histidine, leucine, lysine, méthionine, phénylalanine, proline, sérine, thréonine, tyrosine, valine. La cystine n'a pas été décelée à l'état libre mais seulement après hydrolyse. des extraits aqueux.

Un travail analogue a été présenté par DE VAY (1952) sur les acides aminés libres du blé sain et du blé moisi. Pour l'un comme pour l'autre, la séparation chromatographique sur papier a permis d'identifier 18 acides aminés et un spot inconnu réagissant à la ninhydrine mais disparaissant pendant l'hydrolyse. Par rapport aux résultats obtenus par SULLIVAN et PAYNE sur la farine, l'asparagine, la méthionine et la phénylalanine n'ont pas été décelées ; par contre, les auteurs signalent la présence de tryptophane. En outre, et seulement dans les extraits de blés moisis, d'humidité assez élevée, on a identifié l'acide γ amino-butyrique. La comparaison des chromatogrammes obtenus à partir des blés sains et des blés moisis indiquerait des différences marquées dans les concentrations de certains acides aminés : dans le blé moisi, accroissement de l'alanine, acide γ amino-butyrique, proline, sérine et lysine et diminution de l'histidine.

Dans le précédent tableau, nous avons fait figurer, à côté de la composition quantitative du grain de blé en acides aminés totaux celle concernant les acides aminés libres présents dans un extrait aqueux de mouture entière, telle qu'elle a été déterminée par MOYER et WHITEHEAD (1952) par chromatographie sur colonne d'amidon.

b) Peptides libres : le glutathion du germe

SULLIVAN et HOWE (1937) ont les premiers isolé d'un extrait aqueux de germe de blé un tripeptide réducteur : le glutathion. STERN (1944) a précisé que dans les extraits aqueux de germe, certains groupements — SH sont libres alors que d'autres sont liés aux protéines.

La farine étant formée des constituants cellulaires de la majeure partie du grain de blé, son activité réductrice est fonction, pour une part du moins, de sa plus ou moins grande richesse en fragments de germe. FREILICH et FREY (1943) ont d'ailleurs montré que la teneur en réducteurs de la farine augmente avec son taux d'extraction. BAKER, PARKER et MIZE (1944) ont pu identifier des groupements - SH libres dans la fraction hydrosoluble de la farine, provenant probablement en partie du glutathion du germe.

CONN et VENNESLAND (1951) ont récemment isolé, à partir d'extraits aqueux de germe de blé, un enzyme catalysant la réduction du glutathion oxydé.

Ainsi que l'ont constaté successivement SULLIVAN, NEAR et FOLEY (1936), HULLETT (1940), HULLETT et STERN (1941), SMITH et GEDDES (1942), la fermentation du germe par la levure s'accompagne d'une disparition progressive du glutathion. STERN (1944) a précisé que l'enzyme du germe responsable de la disparition du glutathion est une déshydrogénase. Plus récemment, VUATAZ (1950) a montré qu'il apparaissait, au cours de la fermentation du germe de blé, une substance capable de se condenser avec le glutathion. La substance isolée, apparentée aux α céto-aldéhydes dériverait du germe et non de la levure. Les chercheurs anglais de la Station de Recherches sur les Céréales de Saint-Albans (COSGROVE et coll., 1952) sont parvenus à identifier la substance isolée par VUATAZ ; il s'agit en fait de deux composés, l'un étant le méthoxybenzoquinone, l'autre le 2-6 diméthoxybenzoquinone.

3. — **Les acides aminés des protéines du blé**

Nous adopterons pour cette étude la classification adoptée précédemment en protéines « solubles » (albumines et globulines) et protéines « insolubles » du gluten (gliadine et gluténine) en mentionnant en outre les résultats obtenus par divers auteurs sur les acides aminés constituants du gluten brut lui-même.

L'ensemble des résultats analytiques concernant la composition en acides aminés de ces dernières fractions protéiques a été rassemblé sous forme de tableau.

a) PROTÉINES « SOLUBLES »

C'est à OSBORNE (1907) que l'on doit la première analyse quantitative relative à une albumine (leucosine) extraite du blé. HOFFMANN et GORTNER (1927) devaient ensuite donner la composition en acides aminés d'une albumine isolée de la farine et TILLMANS, HIRSCH et STOPPEL (1928) indiquer la teneur en tryptophane et tyrosine des protéines du blé solubles dans l'eau et les solutions salines.

Selon les résultats analytiques les plus récents, les protéines solubles du « non gluten » ont une teneur plus élevée en lysine et arginine que les protéines constituantes du gluten ; elles sont par contre moins riches en azote aminé.

L'ensemble des travaux concernant les protéines « solubles » du blé a été récemment discuté par PENCE et ELDER (1953) qui ont rapporté les teneurs établies par eux concernant les albumines et les globulines du blé. Nous rapportons ci-dessous l'ensemble des résultats obtenus par divers chercheurs, tels qu'ils ont été présentés par PENCE et ELDER.

Composition en acides aminés du gluten,

En pour 100

(Calculé sur la base d'une

	Gluten						
Alanine	5	5,5	5	—	3,5 (14)	1,7	2,2
Arginine	1,9	4,3	3,9	3,9	2,1	3,3	4,7
Acide aspartique	9,6	—	10	—	—	2,7	3,7
Cystine-cystéine	1,4	1,9	1,7	1,9	—	2,2	1,9
Acide glutamique	26,8	36	27	—	—	28,6	35,5
Acide hydroxyglutamique	—	—	—	—	—	—	—
Glycine	8,6	—	9	7,3	—	2,8	3,5
Histidine	1	2,4	2,2	2,2	2,1	1,9	2,3
Isoleucine	8,6	6	—	3,7	—	3,6	4,6
Leucine			—	7,5	5,9	5,6	7,6
Lysine	1,2	2,1	1,9	2	1,8	1,4	1,8
Méthionine	—	3,3	1,3	1	1,56 (13)	1,3	1,9
Phénylalanine	4,1	2	5,5	5,5	4,2	4,4	5,4
Proline	8	11	10	—	—	10,7	12,7
Sérine	—	—	—	—	—	—	4,7
Thréonine	—	2,5	2,5	2,7	2,7	2,1	2,6
Tryptophane	1,2	1,1	1	1	0,93 (12)	0,9	1,1
Tyrosine	1,3	4,2	3,8	3,8	—	3,4	3,1
Valine	3,3	3	—	4,2	3,5	3,5	4,7
Auteurs	6	7	8	9	selon KUHNAU (1950) 11	15	16

1. OSBORNE (1907). — 2. JONES et GERSDORFF (1925). — 3. BREEZE, JONES (1926). — 4. SULLIVAN et HESS (1930). — 5. JONES (1937). — 6. PADOA (1938). — 7. BLISH (1945). — 8. BLOCK et BOLLING (1945). — 9. BLOCK et MITCHELL (1946-47). — 10. CHIBNALL (1946) selon KUHNAU (1950). — 11. HORN, JONES et BLUM (1946 à 1949). —

des protéines du grain et du son de blé.

des Protides

teneur en N total de 16 %)

Protéines du grain								Protéines du son		
Gliadine					Gluténine		Leucosine	Albumine	Globuline	
2	2,5	2,3	—	—	4,6	4,4	4,4	—	—	—
2,9	3,2	2,6	2,7	2,5	4,7	4,7	5,9	10	14,1	—
0,8	1,4	1,3	—	—	2	2,1	3,3	—	—	—
1,9	2,3	2,1	2,3	2,83 (17)	1,6	1,7	—	3,3 2 (5)	0,5 (4) 1,5 0,7 (5)	—
43,7	46	42	—	—	25,7	27,2	6,7	—	—	—
2,4	—	—	—	—	1,8	—	—	—	—	—
—	1	0,5	—	—	0,9	1	0,9	—	—	—
2,5	2,1	1,6	2	1,85	1,8	1,8	2,8	2,6	2,8	1,86
—	6	—	—	—	—	6	11,3	—	—	3,86
6,6		—	—	—	5,9			—	—	6,35
0,6	0,6	0,5	1	0,66	1,9	1,9	2,7	4,5	11,8	4,15
—	2,3	2,1	2,7	—	—	—	—	1,2 (5)	0,3 (5)	1,31
2,3	2,5	—	—	5,85	2	2	3,8	—	—	—
13	13,2	12	—	—	4,2	4,4	3,2	—	—	—
0,1	0,1	—	—	—	0,7	0,7	—	—	—	—
—	3	2,7	2,7	1,90	—	—	—	—	—	3,50
1,1	0,9	0,8	0,8	—	1,7	1,8	—	4,8	2,8	—
3,1	3,1	2,8	2,8	—	4,2	5,1	3,3	4,2	3,7	—
3,3	3	—	—	2,4	0,2	1	—	—	—	6,56
3	7	8	9	10	3	7	1	2	2	11

12. GREENHUT et Coll. (1946*b*). — 13. REISEN et Coll. (1946). — 14. SAUBERLICH et BAUMANN (1949). — 15. RICE et RAMSTADT (1950). — 16. PENCE et Coll. (1950). — 17. PEREIRA (1952).

Composition partielle en acides aminés des albumine et globuline du blé
(en p. 100 de N total)

	Osborne (1907)	Jones Gersdorff (1925)	Hoffmann-Gortner (1927)	Pence-Elder (1953)
Albumines				
N Total	16,8	15,4	16,7 — 13,5	17,1
N amidé	8,4	7,7	10,7 — 10,3	8,3
N tryptophane	—	4,2	— —	2,6
N arginine	11,4	20,7	15,7 — 10,7	16,3
Globulines				
N total	18,4	17,7	14,8 — 18,3	18,6
N amidé	—	5,9	8,3 — 10,6	6
N tryptophane	—	2,2	— —	0,73
N arginine	—	25,3	14,3 — 18,6	29,5

Le groupe albumine se caractérise par une teneur en tryptophane beaucoup plus élevée que celle des autres protéines du blé et par une teneur faible en azote amidé.

Les globulines se caractérisent chimiquement par des teneurs faibles en tryptophane et azote amidé et par une teneur élevée en arginine.

Par chromatographie sur papier, Sullivan et Payne (1951) ont identifié qualitativement les acides aminés libérés par hydrolyse des protéines solubles de la farine, précipitées par la chaleur ou le méthanol. Les divers acides aminés constituants de ces protéines, type albumines, sont qualitativement les mêmes que ceux décelés à l'état libre dans les extraits aqueux de farine.

Les protéines du son, type albumine et globuline, ont fait également l'objet d'un certain nombre de travaux. Jones et Gersdorff (1925) puis Jones (1937) ont rapporté la composition quantitative en certains acides aminés d'une albumine et d'une globuline extraites du son. Selon Jones et Gersdorff, la globuline serait particulièrement riche en lysine (11,8 p. 100) et selon Jones les teneurs de l'albumine en acides aminés soufrés, cystine et méthionine, seraient plus élevées que celles de la globuline de même origine. Les résultats récents obtenus par Horn, Jones et Blum (1946 à 1949) à l'aide des méthodes modernes d'analyse ne vérifient cependant aucunement les conclusions de leurs prédécesseurs ; si, en particulier, la teneur en lysine demeure plus élevée dans les protéines du son que dans celles des autres régions du grain, elle n'atteint pas la valeur élevée mentionnée par Jones et Gersdorff. On peut voir ainsi combien il convient d'être prudent dans l'interprétation des résultats analytiques obtenus à l'aide de méthodes ne présentant pas la spécificité de celles dont dispose actuellement le biochimiste. Nous avons groupé dans le tableau la composition des protéines « solubles » du son de blé telle qu'elle a été donnée par les auteurs précités. La teneur relativement élevée en cystine de l'albumine du son rapportée par Jones doit être rapprochée de la teneur très élevée en cet acide aminé (15 p. 100) du polypeptide isolé du son de blé par Balls, Hale et Harris (1942).

b) Protéines « insolubles »

Osborne et coll. furent les premiers à entreprendre une étude analytique importante des acides aminés constituants des préparations purifiées de gliadine et gluténine. A ce point de vue, et en raison sans doute de la facilité avec laquelle elle peut être obtenue à partir de la farine ou du gluten, la gliadine a été plus étudiée que la gluténine.

Gliadine

Les très nombreux travaux qui ont été effectués sur la composition en acides aminés de la gliadine ont été passés en revue par BAILEY (1944) et nous nous bornerons à citer pour mémoire les plus essentiels : KOSSEL et KUTSCHER (1901), KUTSCHER (1903), ABDERHALDEN et SAMUELY (1905), OSBORNE (1907), FISCHER et ABDERHALDEN (1907) qui ont identifié un dipeptide constituant de la gliadine : le *l*-leucyl *d*-glutamine. OSBORNE et GUEST (1911), VAN SLYKE (1911), OSBORNE et coll. (1915), BLISH (1916), FOLIN et LOONEY (1922), MAY et ROSE (1922), CROSS et SWAIN (1924), HOFFMANN et GORTNER (1925), TILLMANS et ALT (1925), BREEZE-JONES (1926), NAKASHIMA (1926) qui a identifié un tétrapeptide formé d'une molécule d'acide glutamique, une molécule de tyrosine et deux molécules de glutamine. HOFFMANN et GORTNER (1927), TILLMANS, HIRSH et STOPPEL (1928), JONES et WILSON (1928), JONES et MOELLER (1928), HAUGAARD et JOHNSON (1930), SPORER et KAPFHAMMER (1930), COOK (1931), LARMOUR et SALLANS (1932), FÉLIX et REINDL (1932), TOWN (1941).

La gliadine extraite du son de blé a fait par ailleurs l'objet des recherches de JONES et GERSDORFF (1923-1925), JONES, GERSDORFF et MOELLER (1924), JONES (1937). Ces auteurs ont été les premiers à comparer la composition des protéines du germe et de l'endosperme avec celles isolées des enveloppes du grain. On indique ci-après la composition comparée de la gliadine de l'endosperme et de la prolamine extraite du son en divers acides aminés (en p. 100 de la protéine).

	Gliadine	Prolamine du son
Cystine	1,76	2,29
Arginine	2,97	4,41
Histidine	2,19	0,84
Lysine	1,21	2,45
Tryptophane	1,09	1,37
Tyrosine	3,30	3,38

BLOCK et BOLLING (1945), BLOCK et MITCHELL (1946-1947) ont rassemblé les résultats analytiques antérieurs sur la composition en acides aminés de la gliadine ; ces résultats, de même que ceux rapportés par BREEZE et JONES (1926) ont été reproduits dans le tableau suivant, à côté de ceux plus récents de CHIBNALL (1946) rapportés par KUHNAU (1950). La teneur moyenne en cystine déterminée par PEREIRA (1952) par chromatographie sur papier d'hydrolysats de gliadine est de 2,83 p. 100 des protéines. La prolamine du blé est caractérisée par sa teneur extrêmement élevée en acide glutamique qui constitue à lui seul presque la moitié de la protéine totale, et sa richesse en proline. Elle est assez pauvre en arginine, histidine, thréonine et tyrosine, et surtout très pauvre en lysine et tryptophane.

Certains travaux récents font état d'observations concernant plus particulièrement la structure chimique de la molécule de gliadine. C'est ainsi que KOROS (1950) utilisant une technique chromatographique et après réaction avec le dinitrofluorobenzène calcule que la molécule de gliadine, de poids moléculaire 27 500, contient 3,3 molécules d'histidine ce qui est en accord avec les valeurs obtenues par d'autres méthodes (3 et 3,2). Les 3 molécules d'histidine ont leurs groupements α amino libres et sont liées à la chaîne polypeptidique par leurs groupements —COOH. De son côté, REZNICHENKO (1951) est parvenu à des conclusions intéressantes : dans la molécule de gliadine (de poids moléculaire 26 à 27 000) contenant de 2,5 à 3 p. 100 d'arginine, 1/5 seulement de l'azote aminé total appartient aux groupements w aminés (amines latérales). Les

autres 4/5 constitués par les groupements α aminés (amines terminales) expriment le nombre de chaînes polypeptidiques. Le calcul montre que ces dernières sont d'un type intermédiaire entre les octa et nonapeptides ; chaque molécule de gliadine serait un assemblage de 25 chaînes peptidiques de poids moléculaire 1 080, présentant 25 groupements α aminés terminaux libres.

Gluténine

Bien que les diverses méthodes utilisées pour isoler et purifier la gluténine aient conduit à des produits de composition plus ou moins variable, il demeure possible de dégager, à partir des travaux effectués en ce sens, certaines notions d'ordre général. Nous citerons donc encore pour mémoire les divers auteurs qui ont contribué à préciser nos connaissances, leurs travaux ayant été revus en détails par Bailey (1944) : Osborne et Clapp (1907-1908), Blish (1916), May et Rose (1922), Cross et Swain (1924), Jones, Gersdorff et Moeller (1924), Hoffmann et Gortner (1927), Larmour (1927), Csonka et Jones (1927) sur les gluténines α et β, Jones et Moeller (1928), Tillmans, Hirsch et Stoppel (1928), Cook et Alsberg (1931), Darnodaran (1931), Csonka (1932-1937 *a* et *b*), Neglia, Hess et Sullivan (1938).

Il s'agit, on le voit, de travaux déjà anciens et aucun travail ultérieur concernant la gluténine n'a été publié. Comme on pourra le constater également avec les autres céréales, il semble que l'étude biochimique des fractions protéiques isolées selon le schéma d'Osborne ait été délaissée après qu'il eut été démontré que de telles fractions ne représentaient pas des entités protéiques définies.

Nous avons rapporté dans le tableau récapitulatif la composition de la gluténine en acides aminés telle qu'elle a été donnée par Breeze et Jones (1926) ainsi que les valeurs publiées par Blish (1945) qui semblent être très voisines des premières. Des valeurs similaires ont été indiquées également par Bonner (1950) et Jacob (1951).

La présence d'acide hydroxyglutamique dans la gluténine (comme dans la gliadine) a été indiquée par Dakin (1919) ; mais à la lumière des résultats de Nicolet et Shinoin (1942) on doit considérer le fait comme douteux.

Indiquons les teneurs en quelques acides aminés de fractions protéiques extraites soit du son, soit des remoulages, et apparentées aux glutélines, telles qu'elles ont été données par Jones, Gersdorff et Moeller (1924) et Csonka (1937 *b*) :

	Son	Remoulages
	—	—
Arginine	1,9	3,4
Histidine	0,3	0,3
Cystine	0,5	0,6
Tryptophane	4,8	—

Moins riche en acide glutamique et proline que la gliadine, la gluténine semblerait l'être davantage en arginine, lysine et tryptophane.

Gluten

La composition du gluten en acides aminés reflète celle de ses protéines constituantes et se caractérise par un taux élevé en acide glutamique et important en proline. Il est assez pauvre en acides aminés soufrés, et très pauvre en lysine et tryptophane ; il contient des quantités relativement peu importantes d'arginine et d'histidine.

Telles sont les conclusions que l'on peut dégager des résultats analytiques les plus récents. A côté des résultats déjà complets présentés par PADOA (1938) nous avons reproduit ceux publiés par BLOCK et BOLLING, BLOCK et MITCHELL (1946-1947) et BLISH (1945) qui résument en quelque sorte tous les travaux antérieurs ayant pratiqué des techniques chimiques d'analyse. Les travaux plus récents de RICE et RAMSTADT (1950) et de PENCE et coll., qui ont fait appel aux méthodes microbiologiques d'analyse ont abouti à des valeurs sensiblement différentes, particulièrement en ce qui concerne les teneurs en isoleucine et leucine, en glycine, acide aspartique et alanine. Les résultats de PENCE et coll. (1950) expriment les valeurs moyennes calculées à partir des teneurs individuelles de glutens en provenance de 17 variétés différentes de blés.

L'étude la plus récente sur la composition du gluten en acides aminés a été présentée par DAS et BISWAS (1953) ; il s'agit d'une étude qualitative qui a fait appel à la chromatographie sur papier.

GUILLEMET et COLINEAU (1945) ont présenté une étude comparative sur la composition en acides aminés du gluten d'une farine de blé et des protéines périphériques du grain constituées par le matériel azoté contenu dans l'assise protéique et la bande hyaline. Voici leurs résultats (en p. 100 de l'azote total).

	Gluten	Protéines périphériques	Rapport $\frac{\text{Protéines périphériques}}{\text{Protéines du gluten}}$
N aminé	53,9	63,6	
N ammoniacal	—	6,6	
N humique	0,8	2,7	
N total acides diaminés	15,2	31,2	2
N arginine	7,3	17,8	2,4
N (histidine + lysine)	6,2	12,5	2
N cystine	2,6	2,1	0,8
N total acides mono aminés	61,7	56	
tyrosine	2,35	3,01	1,3
tryptophane	0,57	1	1,7

Ils indiquent que les protéines de la périphérie du grain sont à peu près deux fois plus riches en acides diaminés que les protéines du gluten et, dans un rapport moindre, plus riches également en tyrosine et tryptophane ; la teneur en cystine de l'endosperme serait plus élevée.

4. — **Influence de divers facteurs sur la composition en acides aminés**

Ce sont principalement les facteurs génétiques et agronomiques qui ont attiré l'attention des chercheurs préoccupés de déterminer en quel sens ils étaient susceptibles de modifier la composition en acides aminés des constituants protéiques du blé.

a) INFLUENCE DE LA VARIÉTÉ

LARMOUR (1927) a comparé la composition de la gluténine de diverses espèces de blé et a trouvé que la gluténine du blé commun est plus pauvre en arginine et acides diaminés que les autres espèces examinées. Le taux de ces

acides aminés serait en outre plus faible chez la gluténine que chez les glutélines extraites des autres céréales, à l'exception peut-être de la glutéline du maïs. GREAVES et BRACKEN (1937) ont montré que diverses variétés de blé ont des teneurs en N total et S total différentes ; ils ont pu établir une relation entre N et S total et mettre en évidence que tout le S du blé est sous forme organique. De son côté, CSONKA (1937 *a*) mettait en évidence des différences de composition en acides aminés d'une variété de blé à une autre. GUBLER et GRAVES (1942) ont trouvé des variations de la teneur en cystine de diverses variétés : selon leurs résultats 50 p. 100 environ du S total du blé serait sous forme de cystine ; il existerait d'autre part une corrélation entre la cystine et le soufre total, de même qu'entre cystine et azote total. Plus récemment, TARANOVA (1951) a montré que la composition en acides aminés indispensables des protéines du blé varie d'une variété à l'autre. Il semble donc bien que le facteur variétal exerce une influence non négligeable sur la composition chimique des protéines du blé. Et cependant, d'autres résultats, publiés par PENCE et coll. (1950) tendraient à prouver que cette composition n'est pas affectée par la variété du blé : ces auteurs ont en effet trouvé que la composition en acides aminés de glutens ayant pour origine des blés différant non seulement par leur variété, mais encore par leur teneur en protides et par leur valeur boulangère, demeure très uniforme.

b) INFLUENCE DE LA NATURE DU SOL, DES CONDITIONS DE CULTURE ET DU CLIMAT

Les variations de composition chimique rapportées par GREAVES et BRACKEN (1937), GUBLER et GRAVES (1942), TARANOVA (1951) au sujet des variétés de blé ont été constatées également pour des conditions de culture différentes.

MILLER, SEIFFE, SHELLENBERGER et MILLER (1950) ont dosé certains acides aminés dans différentes variétés de blés vitreux roux d'hiver. Ils constatent que les teneurs en cystine et méthionine sont influencées par la nature du sol, la fumure et le climat, alors que les teneurs en lysine et acide glutamique ne semblent pas modifiées.

MCELROY et coll. (1949) ont rapporté une étude des variations de composition en acides aminés d'un blé d'une même variété cultivé sur différents sols. Pour des teneurs en azote total échelonnées entre 2,64 et 4,03 p. 100, les acides aminés essentiels dosés représentent au total 29,2 à 31,6 p. 100 des protides totaux du grain. Plus récemment enfin, RENNER et coll. (1953) ont déterminé la composition en 9 acides aminés de grains de blé récoltés sur des sols déficients en soufre et ayant subi des fertilisations et des modes de culture différents ; ils ont constaté, entre autres, que l'accroissement de la teneur en protides sous l'influence du mode cultural s'accompagnait d'une baisse des teneurs en acides aminés.

c) INFLUENCE DES FACTEURS TECHNOLOGIQUES

La farine ne contient pas la totalité des protéines du grain, la mouture ayant pour effet d'éliminer plus ou moins complètement les parties périphériques y compris le péricarpe. Nous avons déjà signalé les travaux de JONES et GERSDORFF (1925), de GUILLEMET et COLINEAU (1945), de BARTON-WRIGHT et MORAN (1946) montrant la différence de composition en acides aminés de ces régions périphériques par rapport aux protéines de l'endosperme et leur richesse

particulière en acides diaminés (lysine et arginine) et tryptophane. Il est donc évident que la composition de la farine en acides aminés sera fonction de sa teneur en constituants périphériques du grain, c'est-à-dire de son taux d'extraction.

Csonka (1937 *b*) a montré en effet que les teneurs de la farine commerciale en tyrosine, arginine, histidine et lysine sont plus faibles que celles d'une mouture entière du grain. Par contre, la farine commerciale contiendrait des quantités de cystine et tryptophane proportionnellement plus élevées. Taranova (1951) a lui-même indiqué que la farine extraite à 95 p. 100 est plus riche en lysine que la farine à taux d'extraction de 70 et 30 p. 100.

Dans le domaine technologie boulangère, un tout récent travail de Schormuller, Storig et Leichter (1953) a précisé l'influence de certains agents utilisés dans le traitement chimique des farines. Dans le gluten des farines traitées par divers agents améliorants, les acides aminés suivants : méthionine, cystine, arginine, tryptophane et lysine, ont été dosés comparativement au gluten des farines non traitées. D'une façon générale le traitement a comme conséquence la destruction de méthionine, tryptophane et lysine.

V. — VALEUR NUTRITIVE DES PROTIDES DU BLÉ

1. — Acides aminés limitants

Nous venons de voir que les protéines du blé sont pauvres en certains acides aminés indispensables tels que méthionine, valine et tout particulièrement en lysine et tryptophane. C'est principalement leur déficience en ces 2 acides aminés qui leur confère une faible valeur nutritive.

Les travaux d'Osborne et Mendel (1914) confirmés par ceux de Mitchell et Smuts (1932) ont nettement mis en évidence cet amoindrissement de la valeur nutritive résultant de la déficience en lysine. Csonka (1937 *a*) a souligné de son côté la déficience en tryptophane des protéines du blé, fait que confirmèrent tous les résultats analytiques ultérieurs.

Light et Frey (1943) ont montré que les protéines de la farine blanche sont déficientes en valine aussi bien qu'en lysine. Mitchell et Block (1946) sont d'avis que les déficits en méthionine et isoleucine doivent être considérés comme plus importants encore.

Frey (1951 *b*) a souligné une nouvelle fois l'importance des faibles teneurs en lysine et tryptophane des prolamines des céréales vis-à-vis de leur valeur nutritive, plus particulièrement dans le cas du blé, du maïs et de l'avoine.

Ainsi que le souligne Andrews (1953) la mouture du grain de blé déjà déficient en lysine, a pour effet de fournir un produit, la farine, encore appauvri en cet acide aminé essentiel par élimination de certains constituants tels que le germe et le son dans lesquels la concentration en lysine est la plus élevée.

De même que la farine, la lysine est le seul acide aminé essentiel dont le pain soit vraiment déficient. C'est ce qu'ont montré une nouvelle fois les résultats de Rosenberg et coll. (1954) qui ont suivi la croissance du rat avec un régime à base de pain blanc additionné soit simultanément soit séparément de lysine, méthionine, valine et thréonine.

2. — Valeur nutritive des constituants du grain

a) Farines a différents taux d'extraction

La répartition des acides aminés dans le grain de blé est très inégale ; l'étude précédente a montré que les protéines de l'endosperme ont une composition qualitative et quantitative différente de celles du germe et des régions périphériques. La mouture ayant pour effet d'éliminer les constituants azotés biologiquement les plus importants, il en résulte que la farine destinée à l'alimentation correspondant à un taux d'extraction de 70 p. 100 environ, représente par rapport au grain de blé entier une valeur nutritive réduite.

Nombreux donc ont été les physiologistes qui se sont proposés d'établir ou de préciser la valeur biologique des farines à divers taux d'extraction, en même temps que celle des produits éliminés à la mouture : sons et germes.

Ainsi que l'ont montré successivement Cobb (1905), Morris, Alexander et Pascoe (1945), Moran (1945), Moran et Drummond (1945), Hinton (1947), la qualité nutritive des protéines des régions extérieures de l'endosperme est plus élevée que celle des protéines de l'endosperme interne. La valeur nutritive accrue des protéines de farines à taux d'extraction élevé par rapport à celle des farines de faible taux d'extraction provient donc bien du fait que les premières contiennent une proportion plus forte des protéines des régions périphériques du grain (y compris les cellules à aleurone), plus riches en lysine, tryptophane et arginine. De nombreuses expériences effectuées sur humains ou sur animaux ont démontré que les protéines de la farine ou du grain de blé entier, en dépit d'une digestibilité moindre, avaient une qualité nutritionnelle supérieure à celle de la farine et du pain blanc. Copping (1939) a présenté une revue des travaux réalisés dans ce domaine. Le problème a été également étudié par Murlin, Marshall et Kochakian (1941) et Rostforer, Kochakian et Murlin (1942), Carviotoro et coll. (1952).

Chick (1942) utilisant la méthode sur rats d'Osborne, Mendel et Ferry (1919) a étudié comparativement la valeur biologique respective des farines extraites à 100, 85 et 70 p. 100 : l'efficacité protéique par rapport à celle de la farine blanche est accrue de 17 à 26 p. 100 pour une mouture entière, de 13 à 16 p. 100 pour la farine à 85 p. 100 d'extraction. Graves (1945-1946) parvient aux mêmes conclusions : les protéines du blé entier ont une valeur nutritive plus élevée que celles de la farine blanche. Chick, Copping et Slack (1946) montrent à leur tour que la valeur exprimant l'activation de croissance du jeune rat établie pour des farines à 100 et 85 p. 100 d'extraction est respectivement plus élevée de 20 et 16 p. 100 que celle relative aux protéines d'une farine extraite à 70 p. 100. Chick et Slack (1948) apportent des arguments complémentaires à leurs conclusions antérieures : l'accroissement du poids du rat par g de protéine ingérée est de 1,36 pour la farine blanche, de 1,65 pour la mouture entière.

L'efficacité nutritive de la farine de mouture totale est supérieure d'environ 20 p. 100 à celle de la farine extraite à 70 p. 100.

Les expériences entreprises en France sur le rat par Guillemet et Jacquot (1944) et sur les humains par Jacquot, Trémolières, Guillemet et Erfman (1944) tout en démontrant également la valeur nutritive des protéines périphériques du grain de blé, ont apporté certaines précisions sur la valeur physiologique réelle des farines à divers taux d'extraction. Utilisant la méthode des bilans, ils ont étudié la valeur alimentaire de 3 types de farines (essais

sur animaux) et des pains correspondants (essais sur humains) : mouture intégrale du blé, farine extraite à 70 p. 100, mélange de farine à 70 p. 100 et de farine d'assise protéique correspondant à un taux d'extraction de 85-86 p. 100. La farine dite « d'assise protéique » obtenue par récurage des sons, relativement peu chargée en cellulose, renferme la majorité des éléments nobles caractéristiques des enveloppes du grain de blé. Les résultats obtenus, aussi bien sur le rat que sur l'homme, montrent que les avantages théoriques décelés dans le pain complet par l'analyse biochimique, et en particulier sa supériorité quantitative et qualitative en azote, sont neutralisés in vivo par suite d'une mauvaise digestibilité et d'un accroissement considérable de la perte fécale. Le pain de farine extraite rationnellement à 86 p. 100, qui associe la bonne digestibilité à la richesse en éléments azotés indispensables, permet de tirer le meilleur parti du grain de blé.

b) Son

La valeur nutritive des protéines du *son* a été étudiée par Osborne et Mendel (1919) : elles ont sur le rat une capacité d'activer la croissance plus élevée que les protéines de la farine blanche, résultat confirmé plus tard par Murphy et Jones (1926). Plus récemment Hove, Carpenter et Harrel (1945) trouvent que l'accroissement de poids du rat par gramme de protéine ingérée est de 2 g pour les protéines du son, de 0,5 à 1,2 g pour celles de la farine blanche. A la suite d'expériences effectuées sur le rat et sur le porc, Chick, Cutting, Martin et Slack (1947) constatent que l'accroissement de poids par gramme de protéine ingérée est pour le son environ le double que pour la farine extraite à 70 p. 100.

Quant à la valeur biologique des protéines du son et de la farine blanche, Klein, Harrow, Pine et Funk (1926) ont trouvé qu'elle était respectivement de 57 et 47.

c) Germe

Relativement peu de travaux ont été entrepris sur la valeur nutritive des protéines du germe. Boas-Fixsen et Jackson (1932) et Chick, Boas-Fixsen, Hutchinson et Jackson (1935) en expérimentant sur des rats adultes, ont indiqué que les protéines de l'embryon ont une valeur légèrement supérieure à celle de l'endosperme et sensiblement égale aux protéines du blé entier et du maïs jaune. Les travaux plus récents de Hove et Harrel (1943 *a*) sur le rat ont montré la qualité élevée des protéines du germe vis-à-vis de la croissance et leur valeur de supplémentation dans les régimes azotés déficients. Enfin, la supériorité des protéines du germe de blé par rapport à celles du germe de maïs a été démontrée par Jones et Widness (1946).

3. — Amélioration de la valeur nutritive des protéines du blé et de la farine

Nous aurons plus loin l'occasion d'aborder le problème de la supplémentation des farines de blé par les farines d'autres céréales (seigle, orge, avoine) ou de graines oléagineuses (soja).

Nous dirons simplement que du point de vue nutritif, et si l'on écarte le maïs, l'emploi d'avoine, seigle ou orge en panification ne présente que des avantages. D'ailleurs les mélanges équilibrés pour la protection infantile font

appel à des formules complexes, qui, comme celles de TISDALL, DRAKE et BROWN (1930) renferment à la fois de la farine blanche, des grains de blé et d'avoine, du germe de blé, etc...

Les essais rapportés par SUTTER (1945) et qui concernent plusieurs collectivités d'enfants d'âges différents, sont unanimes à démontrer la supériorité de telles associations sur la seule farine de blé.

Nous citerons par ailleurs certains travaux dont l'intérêt a été de préciser, en y remédiant, les déficiences des protéines du blé en certains acides aminés indispensables.

Cherchant à établir la nature des carences nutritives du gluten de blé par voie biologique, LEWIS, HART et ELVEHJEM (1951) ont obtenu pour le poussin une croissance optimum en enrichissant les protéines du régime en lysine, thréonine et tryptophane. CREMER, LANG, HUBBE et KULIK (1951) ont de leur côté montré que l'addition à la farine de 0,8 p. 100 de *d-l* lysine accroît considérablement sa valeur biologique ; incorporée sous forme de levure sèche à la dose de 1,2 p. 100, la lysine améliore la valeur biologique de la farine uniquement dans le cas de sujets déficients. Une étude de SURE (1952) sur le rat a montré que la valeur protéique d'une farine de régime à base de blé entier était fortement améliorée par adjonction de lysine et de thréonine en association avec la vitamine B_{12}. Le même auteur (1953) a précisé que l'efficacité protéique d'une farine de blé entier passait de 0,68 à 3,11 après supplémentation en lysine, valine et thréonine et addition d'un extrait concentré soluble de poisson. Les protéines du blé ainsi supplémentées ont une valeur biologique égale à celle d'une ration à base de protéines animales (lait).

Enfin, ainsi que l'indiquent les expériences faites sur le rat par BEAUDOIN, MAYER et STARE (1951), la cuisson du blé entier, telle qu'elle est réalisée dans certaines préparations alimentaires à base de blé broyé, détermine un accroissement important de sa valeur nutritive. Par ailleurs et ainsi que l'ont montré les travaux récents de GREER et GRINDLEY (1954) sur le rat, l'accroissement du taux de protides du grain sous l'influence d'une fumure azotée tardive se traduit par une augmentation de sa valeur nutritive.

En résumé, l'amélioration de la valeur nutritive des protéines du blé et des autres céréales par supplémentation en certains acides aminés indispensables, sous une forme ou sous une autre, présente un intérêt réel dans le seul domaine de l'alimentation animale.

L'addition aux produits dérivés du grain de blé des acides aminés dont ils sont dépourvus, et plus particulièrement de la lysine, semble peu justifiée en alimentation humaine du fait que les déficiences sont largement couvertes par les aliments de la ration autres que le pain.

4. — **Facteurs amoindrissant la valeur nutritive**

Les résultats expérimentaux de MILLER et coll. (1950) tendraient à montrer que le *milieu* conditionne dans une certaine mesure la valeur biologique des protéines du blé : les variations quantitatives de la teneur en protides totaux qu'il détermine, affectent également certains acides aminés en particulier cystine et méthionine. BAINS (1953) a trouvé cependant que les variations de la teneur en protides provoquées par l'emploi d'engrais, n'ont pas de répercussion notable sur la valeur biologique de ces protéines.

Le *stockage* du blé sous forme de grains ou de farines est susceptible dans certains cas de modifier la valeur nutritive des protéines. JONES et GERSDORFF

(1939-41) ont constaté in vitro une diminution de la digestibilité des protéines du blé et des produits de mouture au cours de leur conservation. Par contre, MITCHELL et BEADLES (1949) ont observé que la valeur biologique des protéines du blé conservé pendant 2 à 3 ans à 25°C sous forme de grains ou de farines à teneur en eau de 6 à 12 p. 100 n'est pas amoindrie.

Quelques travaux font mention du rôle éventuel qu'exercent certains *améliorants* des farines sur leur qualité nutritive. BENTLEY et coll. (1948) ont constaté que le traitement de la gliadine par NCl_3 provoque chez le chien l'hystérie à un degré élevé. Le facteur toxique responsable pourrait être un dérivé oxydé de la méthionine. Etudiant l'action de ClO_2 sur la valeur nutritive du gluten de blé, ALLISON, WHITE, AJERMAN et ROTH (1950) trouvent, en expérimentant sur le chien, qu'elle n'est pas altérée si on traite la farine à la dose de 1,83 g de ClO_2 p. 100.

Il est reconnu, par ailleurs, que certains *traitements thermiques* pratiqués sur les céréales en industrie alimentaire sont préjudiciables à leur valeur protidique. Une étude détaillée sur le sujet a été présentée par JACQUOT et coll. (1947) montrant que les techniques utilisées en vue de gonfler, souffler, expanser, griller ou biscuiter amoindrissaient la valeur nutritive des céréales en général.

Dans le cas particulier du blé et des produits qui en dérivent, les premiers faits expérimentaux sont dus à MORGAN et KING (1926) et MORGAN et coll. (1931) ; ces auteurs ont pu mettre en évidence que les traitements thermiques à sec et les techniques d'expansion déterminent une baisse légère de la digestibilité et une diminution très marquée des valeurs de croissance ; au contraire, la simple cuisson à l'eau bouillante n'altère pas l'efficacité protidique.

Un travail plus récent de ROUSIER (1944) a cependant établi que la valeur nutritive de la farine boulangère était inférieure de 25 p. 100 à celle du blé entier « éclaté » obtenu par autoclavage suivi d'un séchage sur cylindres. On peut penser que l'amélioration résultant du traitement thermique constatée par l'auteur aurait pour origine une meilleure utilisation des éléments de l'assise protéique du grain libérés après « éclatement ». Une étude systématique des principaux produits industriels trouvés en France (farine de blé cru ou grillé, farine de blé biscuité, flocons de blé) a été entreprise par MATET et coll. (1947) en expérimentant sur le rat et a conduit aux conclusions suivantes : les procédés les plus doux (flocons de blé) n'altèrent pas la valeur protidique du blé et parfois l'améliorent ; les procédés plus énergiques provoquent par contre un abaissement de cette valeur, abaissement d'autant plus considérable que la température est plus élevée et le traitement plus prolongé.

On peut envisager enfin, ainsi que le suggère ANDREWS (1953) que la cuisson du pain ou le « toasting » d'autres produits alimentaires à base de céréales s'accompagne d'une perte supplémentaire d'acides aminés indispensables (lysine) par suite de leur combinaison avec les sucres sous forme de produits colorés lesquels, s'ils accroissent les qualités organoleptiques, présentent une valeur nutritive faible.

VI. — LES PROTIDES DES BLÉS ET DES FARINES ET LA VALEUR BOULANGÈRE

On considère actuellement comme évident d'admettre que la valeur boulangère d'un blé ou d'une farine, exprimée par certaines propriétés plastiques des pâtes qui en dérivent, dépend presque uniquement de la quantité et de la qualité des protides.

En fait, il reste encore à démontrer que la quantité de protides conditionne vraiment la valeur boulangère. Car, si au travers des observations rapportées par les céréalistes préoccupés de cette question, il en est qui semblent bien vérifier cette affirmation, il en est d'autres beaucoup moins démonstratives. SANDSTEDT et OFELT (1940) ont bien constaté en effet, pour une même variété de blé, que la teneur en protides exerce une influence sur la qualité ; mais par contre VITRAC (1948) montre que la quantité de gluten dans un blé ne semble avoir que peu de rapport avec la qualité de ce blé.

Le seul facteur conditionnant la valeur boulangère pour lequel les avis sont vraiment unanimes est la variété du blé considéré. La variété constitue un facteur prépondérant de la qualité ainsi que l'ont montré de nombreux travaux et en particulier ceux de SANDSTEDT et OFELT déjà cités. C'est en tout cas le facteur que l'on peut modifier le plus facilement. Or, il arrive souvent que les variétés de bonne valeur boulangère sont également celles à teneur élevée en protides ; de là l'affirmation qui relie la qualité du blé et sa teneur en constituants azotés.

En faisant donc certaines réserves sur l'importance des teneurs en protides vis-à-vis de la qualité boulangère d'un blé, il reste à montrer en quel sens les protides constituants conditionnent la valeur boulangère d'un blé ou d'une farine.

Si la notion de valeur boulangère d'un blé est liée davantage aux facteurs génétiques et variétaux qu'à ceux relevant du sol ou du climat, il convient néammoins de signaler l'influence non négligeable des traitements fertilisants. PELSHENKE (1937) a mis en évidence l'influence de la fumure sur les qualités boulangères. Selon ses observations, les engrais azotés appliqués seuls auraient un effet plutôt négatif. Le potassium exerce un effet compensateur alors que l'action des phosphates est peu prononcée. Par contre, les engrais organiques auraient une action très favorable.

Les anomalies signalées par PELSHENKE s'expliquent parfaitement si l'on tient compte du stade végétatif auquel la fumure azotée est appliquée. Nous avons en effet déjà eu l'occasion de signaler au début de cette étude les intéressants travaux de COÏC (1950-1952) et de LONG et SHERBAKOFF (1951) montrant l'influence favorable qu'exerce sur la teneur en protides du grain, une fumure azotée tardive. La qualité boulangère des blés et des farines étant, pour une part, conditionnée par la teneur du grain en constituants protidiques, l'effet bénéfique de la fumure tardive s'exerce également sur la valeur boulangère. LONG et SHERBAKOFF auraient mis en évidence que la valeur boulangère des farines est d'autant meilleure que la dose d'engrais azoté est plus élevée et qu'elle a été appliquée tardivement. COÏC et ALEXINSKY (1953), utilisant deux tests distincts d'appréciation de la valeur boulangère (farinographe Brabender et alvéographe Chopin) ont pu constater que l'accroissement de la teneur en gluten du grain consécutif à une fertilisation azotée tardive, était toujours doublé d'une amélioration de la qualité boulangère de la farine. Les résultats obtenus en panification expérimentale (ALEXINSKY et COÏC, 1954) ont confirmé ces constatations.

Par ailleurs, les travaux de RIGBY (1944), GERBRANDT (1946) et KASTING (1948) ont montré que la valeur boulangère des blés récoltés sur des sols pauvres en soufre était fortement affectée par les traitements fertilisants.

L'époque à laquelle s'effectue la moisson serait elle-même susceptible de modifier la qualité boulangère des blés récoltés si l'on s'en rapporte aux observations de ZWEIFEL (1946). La détermination de la qualité du gluten par trois

méthodes différentes a en effet conduit cet auteur à conclure que les grains moissonnés précocement ont une valeur boulangère supérieure à ceux moissonnés tardivement.

A. — Gluten et valeur boulangère

De toutes les céréales, le blé est la seule dont les protéines « insolubles » extractibles sous forme de gluten présentent des propriétés mécaniques exceptionnelles ; c'est également la seule céréale qui permette la confection de pâtes dont les propriétés plastiques, également exceptionnelles, répondent au mieux aux besoins de la panification. Il est donc normal que l'on ait, avant toute chose, pressenti certains rapports entre la valeur boulangère d'un blé et ses protides, en particulier ceux entrant dans la constitution du gluten, et que l'on ait tenté d'établir et de préciser ces rapports éventuels.

1. — Rôle de la composition quantitative et qualitative du gluten en protéines

Les propriétés du gluten de blé étant dans une large mesure responsables du comportement de la farine en boulangerie, on a supposé initialement que la qualité du gluten pouvait être attribuée à des variations de quantité de ses protéines constituantes gliadine ou gluténine ou bien encore à des différences dans le rapport de l'une à l'autre. On pensait en effet que la gluténine donnait au gluten sa solidité et que la gliadine, substance souple et collante, était responsable de la cohésion.

Fleurent (1896 *b*) pensait que la meilleure qualité boulangère correspondait à un rapport gliadine/gluténine = 1/3 ; pour des rapports = 1/4 la pâte était bonne mais ne tenait pas au four ; enfin pour des rapports voisins de 1/2 la pâte se travaillait difficilement. Guthrie (1896) estime que les farines fortes ont une teneur prépondérante en gluténine et que l'accroissement de la teneur en gliadine conduit à un gluten collant et sans élasticité. Guess (1900) trouve qu'il n'y a pas de teneur limitante en ce qui concerne la gliadine, et qu'au contraire, la valeur boulangère est d'autant meilleure que le rapport gliadine/gluténine est plus élevé. Autre avis émis par Snyder (1905) : le pourcentage de gliadine dans la farine est plus important que le rapport gliadine/gluténine.

On voit que les avis sur la question étaient vraiment partagés ; mais si l'on tient compte que les méthodes de détermination pratiquées sont discutables, on doit attacher une valeur toute relative aux conclusions précédentes. Martin (1920) a essayé de relier les propriétés boulangères à une teneur en « gliadine rectifiée » exprimée par la différence : protéines solubles dans l'alcool 50 p. 100 — protéines solubles dans l'eau. Reprenant plus tard le problème posé par Fleurent, Kosmin et Pepzowa (1934 *b*) n'ont observé aucune relation entre la qualité des glutens et le rapport gliadine/gluténine. La détermination des teneurs en fractions gliadine et gluténine de 12 farines d'origine différente, a conduit Chabot (1940) à conclure qu'on ne peut se baser sur le rapport gliadine/gluténine pour apprécier la valeur boulangère. On a depuis renoncé à envisager le problème sous cet angle.

Certains chercheurs ont tenté de relier la valeur boulangère aux différences de caractéristiques présentées par les gliadines ou les gluténines de blés différents. Groh et Friedl (1914) ont montré que les gliadines obtenues à partir de blés durs et tendres avaient des constantes physiques identiques. Wood-

MAN (1922) a trouvé également que les gliadines extraites de farines fortes et faibles étaient identiques par leurs propriétés physiques mais que, par contre, les gluténines présentaient certaines différences. Il semblait donc, ainsi que les résultats de SHARP et GORTNER (1923) devaient l'indiquer à leur tour, que la gluténine exerçât une influence prépondérante sur la force des farines. Mais après examen des protéines purifiées de 7 farines de propriétés boulangères différentes, BLISH et PINKNEY (1924) n'ont pu confirmer les vues de WOODMAN.

L'utilisation d'une méthode de fractionnement des protéines plus nuancée que celles pratiquées à l'origine, a conduit JAVILLIER et DJELATIDES (1934) à exprimer la valeur boulangère d'une farine par le rapport N_2/N_3 fourni par 2 des 4 fractions isolées. Pour un rapport compris entre 1,2 et 2 les farines seraient de bonne qualité ; les farines sont moyennes lorsque ce rapport est compris entre 2,4 et 3 ; enfin elles sont médiocres et mauvaises lorsque le rapport est supérieur à 3. Les résultats obtenus par GEOFFROY et LABOUR (1936) sur 2 farines, l'une de blé de pays, l'autre de Manitoba, n'ont toutefois pas vérifié de telles relations. De leur côté, HARRIS et BAILEY (1937) ont trouvé que des 3 fractions isolées du gluten : gliadine, mésonine et gluténine c'est le groupe gliadine qui serait relié de façon significative au volume du pain. Dans son étude de précipitation fractionnée d'une dispersion de gluten dans le salicylate, HARRIS (1937) a trouvé que la quantité de protéine précipitée par la première addition de SO_4Mg est en rapport avec le volume du pain. Les quantités de protéines précipitées ultérieurement par addition de SO_4Mg à la dispersion ne révèlent aucune relation significative avec le volume du pain. Ces résultats furent confirmés sur un autre blé par HARRIS (1938). Plus récemment HARRIS et FROKJER (1952) rapportent pour 2 variétés de blé que la fraction II du gluten (précipitée à partir d'une dispersion lactique entre pH 5 et 5,5 par $Ca(OH)_2$, est, du point de vue qualité boulangère, nettement supérieure aux autres fractions précipitées et qu'elle se rapproche étroitement, par ses qualités, du gluten original non fractionné.

Les études aux rayons X entreprises par HESS (1953) sur des pâtes à teneur en eau différente lui ont révélé que dans les pâtes, la protéine lamellaire hydratée n'est pas totalement transformée en gluten ; l'auteur admet qu'un certain rapport entre les 2 formes de protéines est essentiel dans une pâte de bonne qualité boulangère.

LAWS et FRANCE (1948) ont tenté d'établir une relation entre la qualité boulangère et le comportement électrophorétique des protéines de blés divers dispersées dans l'acide acétique dilué : aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les diverses farines examinées.

Par contre, et selon AVILA et MIKENBERG (1951), il existerait une certaine relation entre l'indice de gonflement des pâtes faites à partir de diverses variétés de blé et les proportions respectives des protéines constituantes des farines étudiées.

Malgré l'évolution des techniques, il semble bien difficile encore actuellement d'affirmer qu'il est possible de relier la qualité boulangère à la composition quantitative ou qualitative du gluten en protéines.

2. — Rôle de la composition qualitative et quantitative du gluten en acides aminés

Certains auteurs ont envisagé la possibilité d'expliquer les variations de la valeur boulangère par des différences qualitatives ou quantitatives de la

composition du gluten en acides aminés. Blish (1916) puis Cross et Swain (1924) ont comparé la composition d'hydrolysats de protéines en provenance de farines fortes et de farines faibles, mais n'ont pu mettre en évidence de différences significatives. Cependant McElroy, Claudinin, Lobay et Pethybridge (1949) ont pu déceler des différences sensibles bien que faibles dans les teneurs en lysine, arginine et valine de différents échantillons d'une même variété. Pence et coll. (1950) ont déterminé la composition en acides aminés de 17 farines en provenance de blés de diverses variétés, mais n'ont pas trouvé de différences appréciables bien que les caractéristiques boulangères des farines examinées soient notablement différentes. On a, par ailleurs, fait une étude comparée des teneurs en azote total et amidé et du pouvoir réducteur des prolamines et des glutélines en provenance de diverses céréales, dont le blé ; mais là encore, malgré des différences considérables dans les propriétés mécaniques, l'analyse n'a pas révélé de différences marquées. Considérant le problème sous un angle absolument opposé, Rice et Ramstadt (1950) sont parvenus à une même conclusion en montrant que l'identité de certaines propriétés mécaniques ne se retrouve pas dans la composition chimique des protéines. Les auteurs ont pu préparer, à partir de graines de caroube germées, un complexe protéique ressemblant étroitement au gluten de farine de blé non seulement par son aspect, mais encore par ses propriétés d'élasticité et d'extensibilité. La composition quantitative en acides aminés, établie par une méthode microbiologique, est notablement différente d'une protéine à l'autre, bien que leur teneur en azote soit égale. Comparé au gluten de blé, le « gluten » de caroube contient beaucoup plus d'arginine, d'acide aspartique et d'histidine, un peu moins de cystine, d'acide glutamique et de phénylalanine, beaucoup moins de proline et tryptophane. Puisque des protéines de composition chimique très différente présentent des propriétés mécaniques très voisines, il ne semble donc pas que l'on puisse relier leurs propriétés glutineuses à leur composition spécifique en acides aminés.

Quelques faits expérimentaux demeurent cependant favorables à la conception tendant à relier valeur boulangère et composition chimique. Etudiant le rapport soufre/azote dans les blés, Guillemet et Schell (1934) concluent qu'une teneur élevée en soufre protidique entraînerait une mauvaise qualité boulangère, relation confirmée plus tard par Gerbrandt (1946).

Au contraire, Rigby (1944) ayant constaté une relation entre la teneur en soufre du blé et le volume des pains, considérait que cette teneur constituait un meilleur test de la valeur boulangère du blé que sa teneur en protides. Les résultats de Kasting (1948) ne devaient cependant pas établir de relations très significatives entre la valeur boulangère des blés et la teneur en méthionine et cystine du gluten. Et cependant Wostman (1950) ayant déterminé par polarographie la teneur en cystine de farines différentes, a pu constater qu'elle évoluait dans le même sens que les propriétés mécaniques des pâtes correspondantes. Selon lui, la qualité boulangère des farines augmenterait avec le nombre de liaisons -S-S- déterminées par leur teneur en cystine, conclusions rejoignant l'opinion émise antérieurement par Rigby.

En conclusion, il n'apparaît pas, à la lumière des observations qui viennent d'être rapportées, qu'il existe une relation marquée entre la valeur boulangère des blés et des farines et la composition chimique des protéines constituant le gluten.

3. — Rôle des propriétés physiques et mécaniques du gluten

Il est admis depuis longtemps par les céréalistes que la qualité du gluten, sinon sa quantité, conditionne dans une large mesure la qualité des pâtes boulangères. C'est ainsi que de nombreux chercheurs ont été amenés à mesurer et à classer les propriétés mécaniques du gluten pour rendre compte des propriétés boulangères des blés et des farines. Divers appareils permettant de mesurer plasticité, force de tension, élasticité, extensibilité s'adressent directement au gluten brut humide alors que d'autres travaillent des pâtes ou des suspensions de farine. En aucun cas on ne peut considérer que les variations mesurées, traduisant les différences de valeur boulangère correspondantes, sont attribuables exclusivement aux constituants protéiques du gluten, sans tenir compte des autres constituants de nature non protéique.

De telles méthodes offrent évidemment l'avantage de pouvoir chiffrer, par une valeur d'ailleurs tout arbitraire et valable seulement dans des conditions opératoires bien déterminées, la qualité boulangère du gluten et des farines ; mais elles ne permettent pas de préciser la nature et la qualité des facteurs qui conditionnent cette valeur boulangère.

Aussi n'envisagerons-nous, dans cette étude, que les travaux qui se sont préoccupés de relier la valeur boulangère aux propriétés physiques des protéines du gluten.

Les premiers auteurs considéraient que les propriétés du gluten n'étaient pas inhérentes à une variété de blé donnée, mais qu'elles étaient avant toutes choses, conditionnées par le milieu extérieur. Selon Wood (1906-08) et (1907) la force boulangère ne dépendait ni de la teneur en protides ni de la teneur en gliadine, ni du rapport gliadine/gluténine, mais des substances minérales solubles de la farine. Hardy (1909) considérait également que le gluten ne présentait en lui-même ni élasticité, ni ténacité, mais que ces propriétés lui étaient transmises par les électrolytes du milieu. Jago (1911) est d'avis que la valeur boulangère est avant tout conditionnée par le pouvoir du gluten à retenir le gaz formé au cours de la fermentation, cette propriété du gluten étant elle-même tributaire de la présence ou l'absence de certains sels minéraux.

Upson et Calvin (1915-16) ont été probablement les premiers à entrevoir dans le gonflement colloïdal du gluten un indice de la valeur boulangère. Gortner et Doherty (1918) ont trouvé que les glutens de farines fortes ont des vitesses et des capacités d'hydratation beaucoup plus grandes que les glutens de farines faibles. Luers et Ostwald (1920) et Sharp et Gortner (1923) ont démontré qu'il existait une relation entre la force des farines et leur capacité d'hydratation et proposent de déterminer la valeur boulangère par des mesures de viscosité de suspensions de farine dans l'acide lactique dilué. Berliner et Koopman (1929) et l'école des céréalistes allemands, devaient à leur tour proposer une méthode reposant sur les propriétés de gonflement et d'imbibition du gluten sous l'action de l'acide lactique dilué, permettant d'exprimer la valeur boulangère d'une farine.

Les mesures de viscosité appliquées à des suspensions de farine ou des dispersions de gluten devaient constituer ultérieurement, pour de nombreux chercheurs, un test d'appréciation de la valeur boulangère. Harris et Johnson (1940) ont déterminé les viscosités de dispersions de glutens en provenance de divers types de blés et leur vitesse d'écoulement à différentes pressions. Confirmant les observations antérieures de Gortner et Doherty (1918) et de Sharp et Gortner (1923) ils ont mis en évidence des différences dans les

propriétés physico-chimiques des glutens étudiés, différences attribuables à l'état colloïdal des protéines.

Des mesures de viscosité effectuées sur des suspensions de farine par FINNEY et YAMAZAKI (1946) ont fait apparaître une relation linéaire entre cette viscosité et la teneur en protides ; valable pour une même variété de blé, la relation ne s'applique plus si on compare entre elles diverses variétés ; les auteurs proposent alors comme mesure de la valeur boulangère des farines, une détermination de leur capacité de rétention en eau. ZELENY (1947) a préconisé une méthode de sédimentation combinant en une seule détermination les facteurs quantité et qualité des protéines et pouvant rendre compte de la valeur boulangère. L'imbibition de la farine en présence d'acide lactique dilué modifie, en effet, la densité des particules et par suite leur vitesse de sédimentation, pouvant offrir ainsi un moyen de relier l'hydratation à la qualité boulangère.

Une étude récente de GEERDES et HARRIS (1952) a utilisé comparativement divers tests s'appuyant sur les propriétés physiques des protéines en relation avec la valeur boulangère. La détermination des vitesses et des capacités d'hydratation et des viscosités respectives a permis de différencier 2 variétés de blé de qualités boulangères distinctes. Il apparaît en outre que les molécules protéiques des blés étudiés diffèrent entre elles par la taille et par la forme. Les auteurs émettent l'hypothèse que la forme des micelles protéiques conditionne l'hydratation.

On ne saurait trop insister sur l'intérêt présenté par des recherches de cet ordre. Aussi est-il permis d'espérer, malgré la complexité du problème, que l'étude des propriétés physiques et physico-chimiques du gluten, permettra de préciser en quel sens ce constituant protéique du grain de blé et des farines conditionne leur valeur boulangère. Et c'est vraisemblablement par une connaissance plus complète de sa structure physico-chimique qu'il nous sera possible, dans l'avenir, de préciser ce rôle du gluten.

A ce sujet, il nous paraît opportun de mettre en parallèle les modifications apportées par certains agents chimiques aux qualités des pâtes et du gluten et les transformations consécutives qui interviennent dans la structure des molécules protéiques elles-mêmes.

4. — Action des réducteurs et des oxydants sur les protéines de la pâte

Certains agents chimiques sont susceptibles de modifier considérablement, dans un sens défavorable ou favorable, les propriétés des pâtes et de leur constituant protéique essentiel : le gluten ; ce sont les réducteurs et les oxydants.

Les *réducteurs* classiques : bisulfite, cyanure, cystéine, glutathion etc... ont sur la pâte une action qui rappelle celle des enzymes protéolytiques. L'addition de petites quantités de réducteur provoque un ramollissement de la pâte. Elle devient collante, perd son élasticité et ne tarde pas à devenir fluide, rendant impossible la panification. Les phénomènes, qui s'observent de la même façon sur le gluten, sont quasi instantanés et s'accentuent avec la dose de réducteur.

Avec les *oxydants* : oxygène, eau oxygénée, bromates, iodates, persulfates, perborates, percarbonates, trichlorure d'azote, bioxyde de chlore etc... on assiste à un effet inverse si bien qu'on les considère comme des améliorants de panification. Ce rôle améliorant des agents oxydants est connu depuis longtemps et dès 1927, JAMES et HUBER signalaient qu'ils augmentent fortement la limite d'extensibilité et la force à la rupture du gluten. A des doses inférieures au 1/10 000e ils améliorent les qualités boulangères : la pâte hydratée normale-

ment devient plus ferme ; par addition d'eau elle reprend sa souplesse et finalement présente une élasticité supérieure à la pâte faite avec la même farine panifiée normalement. Ces caractéristiques sont durables ; le pain est bien développé et de l'eau supplémentaire est retenue à la cuisson. Certaines farines donnent des pâtes trop souples, manquant d'élasticité et de tenue au four ; un traitement modéré par les oxydants améliore leur qualité boulangère. Par contre, une oxydation trop poussée devient nuisible ; la pâte devient alors ferme et cassante et les pains ne se développent pas.

Bure (1952) a publié une étude passant en revue la liste des divers améliorants chimiques des farines et Bourdet (1952) a fait une étude critique de l'importance qu'il convient d'attribuer aux phénomènes protéolytiques dans l'évolution des pâtes, et du rôle joué par les oxydants et les réducteurs vis-à-vis de ces phénomènes. Il ressort de cette étude que l'action des oxydants et des réducteurs s'exerce tout particulièrement sur les protéines de la pâte, bien que les opinions diffèrent sur la nature des modifications apportées ainsi à la structure du gluten. Nous rappellerons les principales étapes qui ont marqué le développement de nos connaissances dans ce domaine.

a) Mode d'action des oxydants

Kosmin (1934) avait suggéré que les agents oxydants provoquent une coagulation des protéines. Les travaux qui ont suivi ont effectivement montré que les améliorants déterminaient une modification des propriétés physico-chimiques du gluten, mais que cette modification était beaucoup plus complexe qu'une simple coagulation. Baker, Parker et Mize (1942), puis Freilich et Frey (1943) ont envisagé que l'action des oxydants pouvait porter à la fois sur le gluten et les substances réductrices solubles.

Selon Ziegler (1940) l'action du bromate se traduirait par une oxydation des réducteurs hydro-solubles de la pâte en particulier du glutathion ; ses expériences ont en effet montré que le glutathion oxydé améliorait le pouvoir de gonflement du gluten. Hullet et Stern (1941) sont d'avis que la réaction qui intervient est beaucoup plus complexe qu'une simple oxydation de G—SH en G—S—S—G. En fait des travaux plus récents ne semblent pas attacher une grande importance à l'oxydation par les améliorants des réducteurs libres de la pâte. Sullivan et Payne (1951) n'ont pu caractériser ni la cystéine ni la cystine dans un extrait aqueux de farine et n'ont constaté aucune différence entre les extraits provenant de la farine témoin et ceux de la même farine traitée par NCl_3. Holme et Spencer (1952) ont constaté que le bromate et le persulfate ne déterminent aucune diminution apparente des groupements —SH des eaux de lavage de gluten, aussi pensent-ils que les améliorants doivent réagir avec d'autres groupements que les —SH.

On a pensé de même que l'action des oxydants s'exerçait également sur les groupements sulfhydryles des protéines insolubles de la farine. Sullivan, Howe, Schmalz et Astleford (1940) en ont émis l'hypothèse et Baker, Parker et Mize (1944) ont apporté les premiers faits expérimentaux : sous l'action des oxydants, 30 p. 100 des réducteurs du gluten disparaissent. Le même point de vue est partagé par Stern (1944) : « Les phénomènes de maturation des pâtes semblent être liés à l'oxydation des groupements — SH des particules de gluten que contient la farine. » Il ressort d'autre part des travaux de Sullivan (1948) que la cystine R—S—S—R, représentant selon lui les liaisons disulfure du gluten, peut être oxydée en R—SOH, R—SO_2H et R—SO_3H. Toute-

fois l'addition d'oxydants ne modifie pas la teneur de la pâte ou du pain en cystine. Le groupement indol du tryptophane, la fonction thio-éther de la méthionine ne subissent aucun changement dans les pâtes oxydées. D'après les récents travaux de NORDIN et SPENCER (1952), l'action améliorante de l'*o*-iodobenzoate est due à l'oxydation des groupements —SH.

b) MODE D'ACTION DES RÉDUCTEURS

Nous avons signalé par ailleurs l'action dénaturante des réducteurs sur la pâte et le gluten, action se traduisant par une mise en liberté de groupements —SH. (BALLS et HALL 1936). Des opinions assez divergentes ont été émises quant à l'origine de tels groupements. Selon STERN (1944), l'addition de réducteurs à une pâte sous forme d'extraits de germe riches en groupements —SH ne provoque pas de baisse notable de la teneur du gluten en cystine ; par suite, les réducteurs n'auraient aucune action sur les liaisons disulfure du gluten. En 1948, le même auteur constate que l'addition de cystéine à des pâtes détermine bien une libération de substances réductrices mais n'affecte pas la teneur en cystine du gluten. Ses conclusions antérieures sont ainsi renforcées : « le fait que la teneur en cystine du gluten demeure inchangée montre que les liaisons -S-S- de la protéine ne sont pas affectées par la cystéine. »

Une opinion opposée est émise par HITES (1947) dont les travaux sont en faveur d'une scission des liaisons —S—S— de la protéine sous l'action des réducteurs. SULLIVAN (1948) semble confirmer cette façon de voir puisqu'il signale une disparition de 20 à 26 p. 100 de la cystine du gluten par action de la cystéine ou du cyanure. Les intéressants résultats obtenus ultérieurement par HLYNKA (1949), au cours d'une étude relative à l'action de l'acétaldéhyde sur les pâtes traitées au bisulfite, sont également nettement en faveur d'une action des réducteurs sur les liaisons —S—S— du gluten.

Certains faits expérimentaux laissent entrevoir qu'il s'agirait bien en effet d'un processus de cet ordre. ELSWORTH et PHILIPPS (1938) ont pu montrer que le bisulfite rompt les liaisons —S—S— de la laine pour former un composé du type R—SH et peut-être un acide sulfénique instable R—SOH. LINDLEY (1948), traitant la gliadine par le sulfite, a obtenu une dissociation identique. En outre, PATTERSON, GEIGER, MIZELL et HARRIS (1941) ont pu montrer que la laine est sensible aux réducteurs à groupement —SH, ainsi qu'au sulfure et au cyanure, de la même façon que le gluten.

HLYNKA pense néanmoins, dans le cas du gluten, que la réaction consisterait en une coupure des ponts —S—S— plutôt qu'en une oxydo-réduction ; la dégradation du gluten causée par le bisulfite peut en effet être bloquée et même inversée par l'acétaldéhyde, l'association de ces 2 composés ne constituant pas un système d'oxydo-réduction. Toutefois, les différences d'action constatées entre le bisulfite, la cystéine, le glutathion et le sulfure laissent à penser qu'il intervient plusieurs réactions dans ces phénomènes.

— En quel sens alors la structure du gluten serait-elle modifiée sous l'action des oxydants et des réducteurs ?

Si on admet que la structure fondamentale de la pâte est sous la dépendance des liaisons unissant les chaînes protéiques, on peut également admettre que les réactifs modifiant les propriétés du gluten, en particulier son élasticité, agissent en dissociant ou en créant des liaisons interchaînes ou encore en modifiant la structure des chaînes polypeptidiques.

Ainsi que semblent l'indiquer la plupart des travaux mentionnés précé-

demment, les modifications de l'élasticité d'une pâte traitée par un réducteur ou un oxydant pourraient s'expliquer par la rupture ou la reconstitution des liaisons —S—S— du gluten. HLYNKA suggère que « l'on pourrait alors envisager une relation entre la teneur du gluten en liaisons -S-S- et ses propriétés élastiques ». Or, cette suggestion semble étayée par les observations de WOSTMANN (1950) précédemment rapportées, voyant dans la teneur des farines en cystine, donc en liaisons -S-S- possibles, l'indice de leur qualité boulangère. MILLER, SEIFFE, SHELLENBERGER et MILLER (1950) ont pu, de leur côté, mettre en évidence une relation entre la teneur du blé en cystine et la durée de pétrissage nécessaire pour obtenir un développement optimum de la pâte.

DEMPER, HLYNKA et WINKLER (1952) estiment que dans une pâte au repos les liaisons interchaînes demeurent labiles. L'action d'un oxydant, tel que le bromate, se traduirait par une disparition de cette labilité et une création de liaisons fixes. Les réducteurs, au contraire, bien qu'il subsiste encore certains doutes à ce sujet, détermineraient une rupture des ponts —S—S—, entraînant une dislocation de la structure du gluten et, par suite, une désagrégation de la pâte.

En conclusion, et bien que d'autres preuves expérimentales soient encore nécessaires, l'action que les oxydants et les réducteurs exercent sur le gluten, semble affecter principalement les liaisons unissant les chaînes polypeptidiques des protéines, en particulier les liaisons disulfure. Outre une oxydation des substances réductrices solubles, les oxydants auraient pour effet de créer ou de rétablir de nouvelles liaisons —S—S— et de resserrer ainsi la structure des protéines de la pâte.

De telles conclusions apparaissent d'autant plus vraisemblables que les modifications apportées par les oxydants et les réducteurs aux protéines de la pâte sont en tous points comparables à celles qu'ils exercent vis-à-vis des propriétés élastiques de certaines protéines animales comme les kératines. On sait que la kératine des cheveux tire ses propriétés essentielles des liaisons disulfure interchaînes ; on peut contracter ou étirer un cheveu, mais la déformation subie n'est que temporaire. On peut rompre les liaisons —S—S— soit par action de la chaleur humide, soit en traitant le cheveu par des réducteurs à groupement —SH. Le cheveu replié dans ces conditions, est traité ensuite par un oxydant tel que le bromate qui a pour effet de rendre la déformation permanente en rétablissant ou en renforçant les liaisons disulfure. Si on considère l'évolution des propriétés du gluten sous l'influence de ces mêmes agents, il semble bien que les réactions de réduction ou d'oxydation intéressent, comme dans le cas des kératines, les liaisons disulfure interchaînes.

En résumé, il apparaît donc actuellement comme vraisemblable que les propriétés physiques et mécaniques des pâtes soient conditionnées par la structure interne des protéines constituantes du gluten. Il convient en outre, bien que les résultats dans ce domaine soient encore fragmentaires, de retenir le rôle éventuel des liaisons susceptibles d'unir les protéines elles-mêmes et les sucres réducteurs présents dans la pâte.

B. — **Protéines solubles et valeur boulangère**

Bien que quantitativement moins importantes que les protéines du gluten, les protéines solubles du grain de blé ont fait l'objet de nombreux travaux visant à préciser leur rôle éventuel vis-à-vis de la valeur boulangère.

Successivement, SHUTT (1909), OLSEN (1917), ROUSSEAUX et SIROT (1913-

1918), KENT-JONES (1926) ont tenté de relier, avec d'ailleurs peu de succès, la qualité boulangère des blés aux protéines solubles dans l'eau et les solutions salines.

Les travaux de GORTNER, HOFFMANN et SINCLAIR (1929), de SINCLAIR et GORTNER (1933) ont eu pour objet de rechercher une éventuelle relation entre la force d'une farine et le comportement de ses protéines en solution dans diverses solutions salines. HARRIS (1931 *a*, *b* et *c*) a constaté que le pourcentage de protéines solubilisées ou peptisées ne semble pas présenter de relation importante avec la force boulangère mais qu'au contraire, le volume du pain est lié à la teneur en protéines insolubles. Plus récemment, l'étude électrophorétique de LAWS et FRANCE (1948) effectuée sur des extraits aqueux de farines de qualités boulangères diverses, n'a pas permis de déceler des différences significatives. Contrairement aux observations faites par GEERDES et HARRIS (1952) à partir de dispersions protéiques dans le salicylate, les études de peptisation n'ont pas révélé de différences marquées entre les deux blés examinés. Il semble donc peu probable que les protéines solubles du blé ou de la farine exercent une influence marquée sur la valeur boulangère. Et cependant, les résultats de certains autres travaux n'autorisent pas une conclusion définitive.

Les observations de MANGELS (1930) ne permettent pas en effet de rejeter l'influence des protéines solubles sur la qualité boulangère : un blé de force présentait une teneur en protéines peptisables plus élevée qu'un blé ordinaire. CHABOT (1940) a envisagé par ailleurs que le rapport protéines totales/albumine p. 100 de protéines totales pouvait, dans une certaine mesure, rendre compte de la valeur boulangère d'une farine. Le récent travail de PENCE, ELDER et MECHAM (1951) dans ce domaine semble également démonstratif : ces auteurs ont en effet constaté pour les protéines solubles, que la fraction soluble du non dialysable (albumine brute) ajoutée à des mélanges gluten-amidon, augmente le volume du pain et diminue le temps du pétrissage. La fraction dialysable exercerait sur le volume une action moins marquée et tendrait à accroître le temps de pétrissage. Des essais ultérieurs n'ont pas permis à PENCE, WEINSTEIN, MECHAM (1954 *b*) d'établir des relations significatives entre la valeur boulangère et la teneur en protéines solubles de différentes farines ou les proportions de protéines solubles et insolubles. Par contre, ils ont pu mettre en évidence que cette valeur boulangère évoluait dans le même sens que le rapport albumines/globulines.

Bien qu'elles concernent les protéines solubilisées à partir du gluten, il convient de citer à l'appui des faits précédents, les observations rapportées par GUASTALLA (1953) favorables à une relation entre les qualités boulangères de la farine et le degré de solubilisation des protéines dans l'eau. Par des techniques physiques, vérifiées par des déterminations chimiques, cet auteur a montré qu'il y a trois à quatre fois plus de protéine dissoute à partir d'un gluten de Manitoba qu'à partir d'un gluten de blé de pays. Incorporée à un pâton, la fraction solubilisée augmente l'élasticité. En outre, l'oxydation ménagée du gluten par H_2O_2 (dose améliorante) augmente la teneur en protéine dissoute alors qu'à dose oxydante élevée et par suite néfaste, la teneur en protéine dissoute diminue.

Il est bien difficile de conclure à partir d'observations aussi opposées. Il est probable que la diversité des méthodes utilisées est pour une grande part responsable de cette disparité dans les résultats. Mais il est vraisemblable néanmoins qu'une certaine fraction des protéines solubles puisse conditionner la valeur boulangère.

En résumé, s'il semble actuellement acquis que les constituants protéiques du blé et de la farine conditionnent la valeur boulangère, il est également évident que cette influence s'exerce à des degrés divers. La qualité boulangère semble être avant tout tributaire des propriétés physiques et physico-chimiques du gluten, elles-mêmes conditionnées par la structure des protéines qui le constituent. Il n'apparaît pas que la composition qualitative et quantitative du gluten en protéines et en acides aminés puisse être considérée comme un facteur important, bien que quelques résultats encore fragmentaires aient tendance à montrer que ce facteur ne soit pas absolument nul. Il est enfin possible que certaines fractions solubles du stock protidique soient susceptibles, bien que secondairement, d'exercer une influence. Il convient toutefois de faire remarquer que l'étude qui vient d'être faite a concerné uniquement les constituants protidiques des blés et des farines. Or il ne peut être question, lorsqu'on parle de qualité boulangère, de négliger le rôle joué par les constituants glucidiques et lipidiques des farines dans le milieu colloïdal complexe que constitue la pâte boulangère.

Terminons en signalant que les nombreux travaux entrepris en vue d'étudier l'influence de la conservation sur les qualités boulangères des farines ont été passés en revue par BAILEY (1925) et plus tard par CATHCART et KILLEN (1939).

VII. — AUTRES PROTIDES CONSTITUANTS DU BLÉ

Purothionine

BALLS, HALE et HARRIS (1942) ont isolé, à partir d'un extrait de farine par l'éther de pétrole (BALLS et HALE, 1940), une substance cristallisée de nature protéique riche en arginine et surtout en cystine, qu'ils ont appelée « purothionine ». L'analyse a révélé que cette substance est constituée presque uniquement d'acides aminés et diverses actions protéolytiques ont mis en évidence des liaisons de nature peptidique (BALLS, HALE et HARRIS, 1942 *b*). Ce serait un composé intermédiaire entre les holoprotéines et leurs produits de dégradation, et son poids moléculaire serait de l'ordre de 10 000. La protéine cristallisée a des propriétés bactéricides et fungicides (STUART et HARRIS 1942).

Nucléoprotéine

OSBORNE et CAMPBELL (1900) ont isolé pour la première fois du germe de blé une nucléoprotéine. Environ 3,5 p. 100 du germe de blé examiné par OSBORNE et HARRIS (1902) étaient constitués par un acide triticonucléique présentant les propriétés des acides nucléiques d'origine animale, mais moins soluble dans l'eau. Diverses préparations furent effectuées ultérieurement à partir du germe par LEVENE et LAFORGE (1910), READ et TOTTINGHAM (1917), JONES et PERKINS (1925), CALVERY et REMSEN (1927). La plupart des chercheurs s'inspirèrent de la méthode d'OSBORNE et HARRIS (1901) consistant à précipiter la nucléoprotéine d'un extrait aqueux de germe de blé par saturation avec NaCl. CLARKE et SCHRYVER (1917) devaient libérer l'acide nucléique de la nucléoprotéine en extrayant directement le germe à chaud par l'éthanol et en traitant l'extrait alcoolique par ClNa 10 p. 100.

On doit à Lusena (1951) le travail le plus récent dans ce domaine. Après extraction aqueuse du germe, la nucléoprotéine est précipitée en ajustant à 4 le pH de l'extrait ; par redissolutions et reprécipitations successives on obtient une ribonucléoprotéine représentant environ 2,2 p. 100 du germe. La libération de l'acide ribonucléique s'effectue par hydrolyse de la protéine à 80°C et pH 11. Les préparations d'acide ribonucléique ainsi obtenues sont pures à 95 p. 100 d'ARN. Par purification ultérieure, on obtient en définitive un acide nucléique absolument pur (99,6 p. 100).

DEUXIÈME PARTIE

ORGE, AVOINE, SEIGLE, RIZ, MAIS.

L'ORGE

I. — **Teneur en protides.**

II. — **Les protéines de l'orge.**
1. — Caractères de solubilité. Isolement.
2. — Facteurs modifiant la solubilité.
3. — Protéines « solubles » ; fractionnement.
4. — Protéines « insolubles » ; dispersion.
5. — Influence des facteurs génétiques et agronomiques sur la composition en protéines.

III. — **Propriétés physico-chimiques.**
Comportement à l'ultracentrifugation, à l'électrophorèse.
Poids moléculaire — point isoélectrique.
A) Protéines « solubles ».
B) Protéines « insolubles ».

IV. — **Évolution des protéines de l'orge au cours du maltage et du brassage.**

V. — **Les acides aminés de l'orge.**
1. — Acides aminés du grain.
2. — Acides aminés libres.
3. — Acides aminés constituants des protéines.

VI. — **Valeur nutritive des protides de l'orge.**

I. — TENEUR EN PROTIDES

Grain et dérivés

L'orge présente une teneur en protides extrêmement variable ; on a signalé des valeurs comprises entre 8 et 20 p. 100 ; les résultats analytiques situent la teneur moyenne entre 10 et 11 p. 100.

L'orge perlé, dont l'endosperme est réduit, présente une teneur plus faible : 8 à 9 p. 100 avec une teneur moyenne de 8,2 p. 100. La farine d'orge, qui renferme une proportion notable des éléments périphériques du grain, contient environ 10 p. 100 de protides.

Au même titre que le blé la teneur en protides du grain d'orge est conditionnée à la fois par la variété et par le milieu. Les travaux récents de GASTLER et HALVERSON (1952) l'ont montré. L'influence exercée par l'apport d'engrais sur la richesse du grain en constituants azotés ressort également des observations de HOFMANN et NIGGEMANN (1954) ; seules les doses massives d'engrais azotés provoquent un accroissement de la teneur en protides. Elle s'abaisse par contre par emploi d'engrais « complets » contenant de la potasse.

II. — LES PROTÉINES DE L'ORGE

1. — Caractères de solubilité. Isolement

Osborne (1895) à qui l'on doit la première étude systématique des constituants azotés de l'orge, définissait en fonction de leur caractère de solubilité, 5 fractions protéiques distinctes :

1° une albumine, la *leucosine,* soluble dans l'eau et les solutions salines diluées ;

2° une globuline, l'*édestine,* soluble dans les solutions salines (ClNa 10 p. 100) ;

3° des protéoses, solubles dans l'eau ;

4° une prolamine, l'*hordéine,* soluble dans l'alcool froid 75 p. 100 ;

5° une glutéline soluble dans les acides et les alcalis dilués.

Voici les résultats publiés par Osborne en 1895 concernant la composition en diverses protéines d'une mouture entière d'orge à 10,75 p. 100 de protides.

	p. 100 du grain
Albumine (leucosine)	0,3
Globuline + protéoses	1,95
Prolamine (hordéine)	4
Glutéline	4,5

Cette dernière fraction, non isolée à l'état « pur » était évaluée par différence, après extraction des autres fractions.

Une étude analogue fut effectuée sur le malt par Osborne et Campbell (1896) qui permit d'identifier les protéines suivantes : une albumine, trois protéoses, une glutéline, une globuline appelée *bynédestine* et une prolamine dénommée *bynine*.

On admettait alors que, lors de la germination, ces deux dernières protéines représentaient les produits de transformation des protéines initiales de l'orge édestine et hordéine, cette transformation se traduisant par un enrichissement en carbone et un appauvrissement en azote.

Ces dénominations concernant les protéines du malt furent d'ailleurs définitivement abandonnées lorsque Bishop (1928, 1929 et 1930) s'inspirant des constatations faites par Osborne sur l'orge, proposa une nouvelle méthode d'extraction des divers groupes protéiques ; albumine et globuline sont extraites ensemble par une solution saline diluée (SO_4K_2 5 p. 100) ; l'hordéine par l'alcool 70 p. 100 bouillant ; la fraction gluténine étant évaluée par différence.

2. — Facteurs modifiant la solubilité

Tel qu'il avait été défini par Osborne, puis par Bishop, le fractionnement des constituants azotés de l'orge en divers groupes protéiques, fondé sur des différences de solubilité, demeurait néanmoins tributaire de nombreux facteurs et en particulier du mode opératoire lui-même. C'est ce qui ressort de diverses observations.

Bien que Rose et Anderson (1936) aient mis en évidence l'individualité de la fraction N sel soluble de Bishop, les travaux de Bang (1930), Urion et Golovtschenko (1940), Scriban (1949) font ressortir l'influence de la *finesse de mouture* sur la quantité de protéines solubles extraites.

Halverson, Grafius et Moxon (1952) ont étudié l'influence de trois méthodes de broyage différentes sur la répartition de l'N des fractions solubles dans les solutions salines et dans l'alcool d'orges de diverses variétés. Leurs résultats ne font pas ressortir de différences dans la composition en protéines.

Peuvent intervenir également *température, pH, concentration et nature de la salinité* ; c'est ce qu'ont pu montrer Urion et ses élèves : Urion, Lejeune et Golovtschenko (1944) ; Urion, Lejeune et Collin (1944) ; Urion, Lejeune et Theec (1944).

Une étude récente de Lejeune (1952) montre que, selon le mode opératoire, l'N sel soluble s'accroît aux dépens de l'N glutéline. La fraction hordéine au contraire n'est pas affectée par les conditions d'extraction et reste remarquablement constante.

Vassel, Stephens et Howard (1949) ont étudié la solubilité des constituants azotés de l'orge dans le cas particulier des grains épuisés en brasserie. Les solvants habituels eau, solutions salines, acides ou alcalis dilués extraient moins de 10 p. 100 de l'N des grains entiers. Après mouture et contact prolongé on peut extraire par la soude jusqu'à 90 p. 100 de l'N mais on favorise en même temps la dispersion des constituants non azotés. On peut précipiter environ 75 p. 100 de l'N dispersé à pH 3,75 ou 4,75 et 85 p. 100 en présence de SO_4Na_2 ou SO_4 Mg 30 p. 100 à pH 4,1. Le produit isolé contient 4,75 p. 100 seulement d'N et 69,3 p. 100 de glucides.

La dénaturation plus ou moins poussée des protéines sous l'action de la *chaleur* constitue un autre facteur susceptible de modifier leur solubilité. Lenarskij (1951) a constaté que le chauffage modéré des grains d'orge modifie le degré de solubilité des albumines et globulines. Selon Hultin (1949), la coagulation de l'albumine de l'orge et du malt commence à 65°C et affecte une même quantité de protéine, indépendamment du pH. La coagulation s'accroît progressivement entre 70 et 80°C mais reste inchangée de 80 à 90°C.

S'il est donc amplement démontré que le fractionnement du matériel protéique du grain d'orge est fortement influencé par les conditions d'extraction, on possède néanmoins actuellement suffisamment de résultats pour qu'il soit possible de donner les proportions respectives des diverses fractions azotées isolées selon le schéma général proposé par Bishop.

Hopkins et Krause (1947) puis Scriban (1951) ont donné la composition moyenne en protéines de l'orge et du malt, Szylvinyi et Killian (1953) celle de l'orge difficilement maltable. Nous reproduisons dans le tableau suivant les résultats analytiques publiés successivement par Rokita (1953) puis Biserte et Scriban (1954).

Composition moyenne en fractions protéiques de l'orge et du malt
(p. 100 de N Total)

	Orge		Malt
N Sel soluble (Albumine + Globuline Ac. aminés, polypeptides libres)	26,8 à 34	27,1	50,7
N Hordéine	15,1 à 22,9	35,1	20,6
N Glutéline	17 à 22,2	12,3	2,7
N résiduel	24,7 à 37	25,5	26 —
	Selon Rokita (1953)	Biserte et Scriban (1954)	

Les résultats de Rokita concernent 17 variétés d'orge ; ils diffèrent de façon assez sensible des valeurs obtenues par Bizerte et Scriban en ce qui concerne le fractions hordéine et glutéline. Les conditions expérimentales de

ces derniers auteurs étaient les suivantes : après extraction de la farine d'orge par ClNa M/1 dans un tampon phosphate pH 7, l'hordéine est extraite par l'alcool 70° à 78°C ; à partir de la fraction restante, les auteurs distinguent l'N Glutéline extractible par KOH alcoolique M/5 dans l'alcool 45° de l'N résiduel.

Il apparaît donc, dans l'état actuel des recherches, que les fractions azotées glutéline et résiduelle demeurent encore assez mal définies. Szilvinyi et Lampl (1953) ont cependant montré que les protéines résiduelles de l'orge peuvent être séparées en deux fractions, l'une soluble dans NaOH 1 p. 100 à froid, l'autre à chaud, la première fraction étant dépourvue de tyrosine, isoleucine, proline et histidine.

3. — **Protéines « solubles ». Fractionnement**

Les recherches de Brown (1907) sur les substances azotées de faible poids moléculaire des extraits d'orge et de malt l'avaient conduit à séparer, entre autres, les albumoses solubles dans l'eau et dans l'alcool et précipitables par $SO_4(NH_4)_2$ en deux fractions distinctes, l'une étant vraisemblablement constituée d'albumine, l'autre de globuline.

Le fractionnement des protéines solubles dans les solutions salines diluées fut réalisé ultérieurement par voie chimique ou thermique. Schjerning (1914), Bishop (1928-1929) ont utilisé $ZnCl_2$, SO_4Mg, CCl_3COOH. Urion et Raux (1939), Urion et Lejeune (1940) ont utilisé trois agents de précipitation : le chauffage pour les protéines du type albumine, SO_4Mg saturé pour celles du type globuline et l'acétate d'urane pour les produits intermédiaires. Ils ont en effet constaté qu'une partie du matériel azoté de la fraction sel soluble se composait d'acides aminés et de composés intermédiaires : ils ont ainsi trouvé 33 p. 100 d'albumine, 31 p. 100 de globuline, 20 p. 100 de produits intermédiaires et 16 p. 100 de substances non précipitables (acides aminés et peptides).

D'une façon générale, de telles méthodes de précipitation ont donné des résultats arbitraires en raison de leur brutalité et des risques inévitables de dénaturation provoqués.

Plus récemment, Scriban (1951) a préféré faire appel à la dialyse pour fractionner les extraits sel-solubles. Il a pu ainsi montrer que les protéines solubles de l'orge peuvent se répartir en deux fractions :

— une fraction dialysable, représentant les acides aminés et les peptides de faible poids moléculaire ;

— une fraction non dialysable, contenant les protéines du type albumine et globuline et des peptides de poids moléculaire relativement élevé. Cette fraction représenterait 58 p. 100 de l'azote sel soluble dans le cas de l'orge, de 35 à 47 p. 100 dans le cas du malt.

Biserte et Scriban (1952) ont caractérisé les fractions polypeptidiques par l'agent de précipitation qui les définit : acide trichloracétique 5 p. 100, alcool absolu à 0°C, acétone à 0°C, hydroxyde de Cd, $SO_4(NH_4)_2$ avec ou sans relargage. Ils ont en outre abandonné les appellations anciennes des fractions mal définies telles que protéoses, albumoses, peptones, qui n'ont aucun sens du point de vue moléculaire.

Étudiant la composition en « protéines solubles » de diverses variétés d'orge, Jensen (1953), après isolement des globulines a, par saturation croissante des extraits au $SO_4(NH_4)_2$, isolé trois fractions protéiques distinctes apparentées aux albumines. Rondelet et Lontie (1953) ont par ailleurs décrit un appareillage permettant de réaliser le fractionnement continu des albumines et

globulines de l'orge : les protéines extraites par une solution saline sont précipitées et introduites dans une colonne de Kieselguhr ; le mélange est alors soumis à l'extraction par $SO_4(NH_4)_2$ de concentration graduellement décroissante et l'élution suivie au spectrophotomètre.

4. — Protéines « insolubles ». Dispersion

Les méthodes de fractionnement préconisées par OSBORNE puis BISHOP se bornaient, dans le cas des protéines insolubles, à extraire l'hordéine par l'alcool, et à déterminer la teneur en glutéline par un calcul de différence, sans en réaliser l'isolement. Il s'est révélé d'ailleurs difficile d'extraire quantitativement la glutéline du résidu insoluble très riche en matériel non protéique.

On a essayé d'extraire les protéines insolubles de l'orge de la même façon que celles du blé par dispersion dans des solvants acides ou neutres appropriés. CUNNINGHAM et ANDERSON (1950-1951) ont préparé des « glutens » d'orge en utilisant comme agent de dispersion l'acide formique 0,01 M. Par une méthode analogue à celle utilisée dans le cas du seigle, HAGBERG (1952) a de son côté préparé à partir d'orge un gluten par dispersion dans l'acide lactique dilué suivie d'une précipitation par neutralisation ou addition de sels. Le gluten obtenu dans ces conditions paraît de nature plus faible que le gluten de seigle.

HARRIS, SIBBIT et BANASICK (1948) ont fait appel à des agents de dispersion neutres tels que le naphtyl et le phénylacétate de Na, pour extraire le gluten de diverses farines de céréales et de la farine d'orge en particulier.

LONTIE, RONDELET et DULCINO (1953) après élimination des albumines et globulines par les solutions salines et de la prolamine par l'alcool isopropylique 60 p. 100 à chaud, sont parvenus à solubiliser la fraction glutéline de l'orge en additionnant l'alcool isopropylique de 0,2 p. 100 de métabisulfite.

5. — Influence des facteurs génétiques et agronomiques sur la composition en protéines

A la suite de nombreuses analyses d'orge de diverses variétés, BISHOP avait mis en évidence la régularité de la composition azotée du grain. Pour des échantillons d'une même variété, mais différemment riches en azote, la teneur en glutéline reste constante par rapport à l'azote total, tandis que le taux d'hordéine augmente avec la teneur en azote et que le pourcentage d'azote soluble décroît. Ces constatations importantes sont connues sous le nom de « principe de régularité de BISHOP ».

Il ressort des travaux de URION, LEJEUNE, FRONSACQ et COLLIN (1951) que les variations de composition constatées soit sous l'influence saisonnière, soit lors de la trempe et de la printanisation, témoignent de l'interdépendance des fractions albumines-globulines, hordéine et glutéline de l'orge. Les résultats obtenus par LEJEUNE (1952) l'ont conduit à considérer que la fraction hordéine est une propriété caractéristique personnelle de même que la fraction glutéline est une propriété variétale.

BROHULT (1953) rapporte les observations de SAVERBORN, selon lesquelles dans le cas particulier des globulines, la concentration des composants α, β, δ et γ, varie d'une variété d'orge à une autre ; pour une même variété, le taux des divers composants varie également d'une année à l'autre et en fonction des conditions climatiques, spécialement en ce qui concerne les constituants α et γ.

On doit à JENSEN (1953 *a* et *b*) une étude détaillée relative à l'influence du climat, des conditions de culture et de la variété sur la composition des grains d'orge en protéines type albumines-globulines. Les diagrammes d'ultracentrifugation de quelque 100 préparations protéiques font ressortir des différences de composition à la fois qualitative et quantitative, sans qu'il soit possible d'affirmer qu'il existe une relation entre les différences constatées et les qualités brassicoles des variétés étudiées.

III. — PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES

A) Protéines « solubles »

Les observations d'URION et coll. mettaient déjà en évidence que le matériel azoté extrait par les solutions salines présentait une complexité plus grande que les protéines initialement caractérisées. En précisant leurs propriétés physico-chimiques les techniques modernes d'ultracentrifugation, d'électrophorèse, de polarographie allaient permettre de faire des progrès importants dans la connaissance des protéines « solubles » de l'orge.

Dès 1937, QUENSEL et SVEDBERG ont observé l'hétérogénéité de la fraction albumine-globuline de l'orge soumise à l'ultracentrifugation et à l'électrophorèse différentielle. BISERTE et SCRIBAN (1950 *a*) et SCRIBAN (1951) ont, à leur tour, au terme d'une étude électrophorétique de cette fraction, mis en évidence la complexité des protéines constituantes. HEILMER (1952) a proposé tout récemment une méthode d'analyse des protéines de l'orge utilisant les techniques de l'électrophorèse.

Enfin, la méthode d'électrophorèse continue sur papier selon GRASSMANN (1951) a été récemment appliquée par RONDELET et LONTIE (1953) au fractionnement des albumines et globulines de l'orge.

SANDEGREN (1949), SANDEGREN, SVOMINEN et EKSTROM (1949) ont fait une étude polarographique des protéines solubles de l'orge, l'activité polarographique résultant de la présence dans leur molécule des groupes —S—S— et —SH.

NAIM (1948) par dialyse, électrophorèse et précipitations diverses a séparé des deux fractions protéiques classiques de l'orge, une 3e fraction riche en phosphore.

KENT et MACHEBŒUF (1949) après extraction d'une farine d'orge par SO_4K_2 5 p. 100 et dialyse de la solution obtenue ont à leur tour précipité une fraction relativement pauvre en azote mais riche en phosphore (1,25 p. 100) contenant probablement de la phytine. D'autre part, en traitant la solution saline par $SO_4(NH_4)_2$ à la concentration de 22,5 p. 100, à 0°C et à pH 5,5, ils ont obtenu un précipité qui, soumis à l'électrophorèse, révèle la présence de deux composants dont l'un représente 85 p. 100 du précipité.

La nature complexe du matériel protéique est donc apparue à mesure que se développaient les méthodes d'investigation. Aussi n'est-il guère possible dans l'état actuel de nos connaissances de considérer comme entités chimiques définies les protéines appelées albumine et globuline par OSBORNE. Il ressort au contraire de l'étude des propriétés physico-chimiques des constituants solubles isolés qu'ils représentent un matériel hétérogène.

a) Albumine ou leucosine

Quensel (1941) examinant la leucosine de l'orge à l'ultracentrifugation admettait qu'elle était poly-dispersée ; de fait, la fraction préparée contenait encore certaines impuretés. Danielsson et Sandegren (1947) ont perfectionné ensuite la technique de fractionnement de Quensel (1942) qui avait conduit ce dernier à attribuer à la protéine un pH_i de 5,8 ; par fractionnements répétés au SO_4 $(NH_4)_2$ à 70 p. 100 de saturation et dialyses successives, Danielsson et Sandegren ont purifié soigneusement l'albumine, d'un poids moléculaire de 54 000. Ils ont montré qu'il s'agissait d'une protéine homogène et que l'albumine de l'orge et du malt, ayant même constante de sédimentation, étaient identiques. Les travaux de Hultin (1949) précisèrent que le point isoélectrique était situé à pH 4,6.

Considérée comme protéine homogène, la fraction albumine de l'orge s'est révélée cependant beaucoup plus complexe qu'on ne l'avait établi jusqu'alors. Par précipitations répétées de l'extrait aqueux Nihlen et Ayrapa (1951) obtiennent une solution qui est dialysée contre l'eau tenant en suspension des résines échangeuses d'ions. L'analyse électrophorétique montre que l'albumine contient plusieurs groupes de protéines.

Des conclusions identiques se dégagent des observations de Jensen (1953) : les diagrammes d'ultracentrifugation des fractions protéiques apparentées aux albumines isolées d'orge de diverses variétés mettent en évidence des différences d'ordre qualitatif (poids moléculaire) et quantitatif.

b) Globuline

Par précipitation au $SO_4(NH_4)_2$ Quensel (1942) a mis au point un fractionnement de l'extrait salin d'orge contrôlé par ultracentrifugation à 68 000 t/mn. Il a obtenu quatre fractions ou groupes de globulines assez bien définies désignées par α, β, δ, γ par ordre de poids moléculaire croissant, la β globuline étant précipitée jusqu'à 15 p. 100 de saturation en $SO_4(NH_4)_2$, les globulines α, δ, γ précipitées entre 40 et 70 p. 100 de saturation du même sel ; une fraction mal définie qui n'a pas été étudiée en détails précipite entre 15 et 40 p. 100 de saturation.

Des études analogues faites sur d'autres céréales : blé, (Saverborn et coll. (1944)), seigle, avoine, maïs (Danielsson, 1949) ont montré que l'orge était la seule céréale contenant la β globuline. Du point de vue répartition anatomique la γ globuline est localisée dans l'embryon, tandis que les cellules à aleurone relativement riches en γ, contiennent surtout les formes α et β ; l'endosperme est très pauvre en globulines.

Par ultracentrifugation, diffusion, électrophorèse, Quensel put établir certaines caractéristiques physico-chimiques des diverses globulines dont nous rapportons ici les valeurs de poids moléculaire et de point isoélectrique :

	α	β	γ	δ
Poids moléculaire	29 000	100 000	166 000	300 000
pH*i*.....	5	4,9	5,7	?

La richesse particulière en S de la β globuline permit son étude polarographique par Sandegren, Svominen et Ekstrom (1949). Jensen (1952) utilisa également les méthodes de Quensel pour préparer la β globuline de l'orge afin d'en établir sa composition en acides aminés.

B) **Protéines « insolubles »**

L'étude des propriétés physico-chimiques des fractions hordéine et glutéline isolées individuellement a fait apparaître, comme dans le cas des fractions albumine et globuline, leur non-homogénéité ainsi qu'il ressort de divers travaux.

a) Hordéine

Dès 1907, Lindet et Amman ont préparé des fractions hordéine différant en pouvoir rotatoire spécifique. Quensel et Svedberg (1937) ont montré que des diverses prolamines, seule l'hordéine était monodispersée à l'ultracentrifugation et lui ont attribué un poids moléculaire de 27 500. Par contre Wallis (1950-1951) partant de solutions d'hordéine dans le dioxane aqueux, n'a pu isoler de fraction pure à caractéristiques bien définies ; il a mis en évidence l'hétérogénéité de l'hordéine (au moins 4 constituants) par l'étude des caractères de solubilité. Les études d'électrophorèse de Biserte et Scriban (1950 *a* et *b*), Scriban (1951), ont mis également en évidence la présence d'au moins 5 constituants de la fraction hordéine et par suite son hétérogénéité.

L'hordéine ne serait donc pas une protéine homogène et sa complexité s'apparenterait aux prolamines correspondantes du blé et du maïs, gliadine et zéine, également hétérogènes à l'électrophorèse (Schwert et coll., 1944, Scallet, 1947). Son caractère monodisperse à l'ultracentrifugation s'expliquerait alors par le fait que ses constituants, de poids moléculaire très voisin, ne pourraient être différenciés.

Kolessov (1951) a établi par la même méthode, pour la prolamine du blé, que la molécule d'hordéine serait constituée d'une association de polypeptides relativement courts, contenant de 7 à 12 restes d'acides aminés.

b) Glutéline

Par précipitation au $SO_4(NH_4)_2$, Csonka et Jones (1929-1930) ont séparé deux glutélines α et β ; ils attribuent à la glutéline α un point isoélectrique de 6,4. Les conclusions présentées récemment par Scriban sur la composition chimique des différentes fractions protéiques isolées de la glutéline de l'orge sont également en faveur d'une hétérogénéité de cette protéine ; toutefois cette hétérogénéité ne ressort pas de la composition chimique.

IV. — ÉVOLUTION DES PROTÉINES DE L'ORGE AU COURS DU MALTAGE ET DU BRASSAGE

L'importance primordiale de l'orge en tant que matière première de la technologie brassicole, mérite que l'on fasse mention de l'évolution des diverses fractions azotées du grain au cours du maltage.

La première étude systématique sur l'évolution des fractions protéiques de l'orge au cours du maltage est celle de Bishop (1929) ; elle établit que l'azote total ne varie pratiquement pas au cours du maltage (malt avec radicelles) ; mais tandis que la fraction albumines globulines varie très peu, les fractions hordéine et glutéline, constituant les protéines de réserve du grain, sont protéolysées rapidement.

D'autres travaux sont venus confirmer les observations de Bishop : Takahashi et Shirahama (1931-1932), Fink et Kunish (1937), Massart (1946).

Si la concentration globale en protéines solubles est sensiblement inchangée, il apparaît que la fraction globulines subit des modifications qualitatives assez profondes. SAVERBORN, DANIELSSON et SVEDBERG (1944) ayant suivi l'évolution des diverses globulines de l'orge au cours du maltage, ont fait les observations suivantes : l'α globuline diminue légèrement, la γ globuline dans des proportions plus importantes et le composé δ disparaît complètement. La β globuline au contraire ne subit aucune modification.

On doit enfin à SCRIBAN (1951) une étude de l'évolution des différentes fractions protéiques de l'orge au cours du maltage confirmant les idées énoncées précédemment par BISHOP (1949), et résumant en quelque sorte les transformations essentielles subies par les constituants protéiques dans l'opération du maltage : augmentation des composés azotés simples du grain (acides aminés et peptides) aux dépens de glutéline et hordéine.

L'importance du degré de solubilité des protéines du malt pour la fabrication de la bière ressort des travaux de WOHRER (1953) montrant également la nécessité d'éliminer pendant la cuisson du moût les protéines responsables de différentes sortes de troubles. On doit à ALLOUF et coll. (1953) une étude des protéines du malt au cours des diverses étapes du brassage ainsi que l'analyse du précipité constituant le trouble à froid irréversible de la bière. BISERTE et SCRIBAN (1953) ont présenté une étude détaillée de l'évolution quantitative des protéines complexes et des polypeptides adialysables au cours du maltage et du brassage. Parallèlement, les polypeptides dialysables, de poids moléculaire plus faible, ont été fractionnés par ionophorèse, chromatographie sur résines échangeuses d'ions, et chromatographie sur colonne et sur papier.

Nous avons emprunté à une publication récente de ces mêmes auteurs (1954) le tableau résumant l'évolution des différentes fractions protéiques de l'orge au cours du maltage et du brassage.

Evolution des différentes fractions protéiques de l'orge au cours du maltage et du brassage (selon BISERTE et SCRIBAN, 1954)

Bilan de l'azote calculé sur la base d'un kg de malt contenant 10 p. 100 de protides.

	Protides totaux	Acides aminés Oligopeptides	Polypeptides dialysables et adialysables	Albumines	Globulines	Hordéine	Glutéline + N résiduel
	g	g	g	g	g	g	g
Orge (1030 g)	105	13		8	14	40	30
						(92)	
Malt (1000 g).....	100	41		6	8	20	24
						(59)	
Moût avant fermentation (5 litres à 5 degrés)	40	32			(8)		
Bière (5 litres à 5 degrés) .	15	12	3		(0)		

Au cours du maltage les abondantes protéines de réserve de l'orge subissent une protéolyse intense qui en transforme une grande partie en produits de faible poids moléculaire : acides aminés et polypeptides. La préparation du

moût élimine presque complètement les protéines restantes, de telle sorte que les composés dialysables représentent à ce stade les 4/5 de l'azote protidique.

Au cours de la fermentation, plus de la moitié de l'azote assimilable est utilisé par la levure et la quasi totalité des protéines disparaît.

V. — LES ACIDES AMINÉS DE L'ORGE

1. — Acides aminés du grain

Nous avons reporté dans le tableau ci-contre les résultats les plus récents concernant la composition en acides aminés du grain d'orge, de l'orge perlé et du malt.

De même que pour les autres céréales, les techniques d'analyse faisant appel à la chromatographie ont permis de préciser et le plus souvent de confirmer les résultats obtenus à l'aide des méthodes microbiologiques. La chromatographie sur colonne d'amidon ou sur résines échangeuses d'ions a été utilisée conjointement par LJUNGDAHL et SANDEGREN (1953) et DUSTIN et coll. (1953) pour déterminer quantitativement la composition en acides aminés d'hydrolysats acides de grains d'orge. Le bilan azoté des 16 acides aminés dosés par LJUNGDAHL et coll. représente 72 p. 100 de l'azote total de l'orge. Les déterminations de DUSTIN et coll. réalisées sur une mouture entière, donc en présence de fortes quantités de glucides, rendent compte de 87,5 p. 100 de l'azote total.

Certains travaux ont signalé les variations de composition en acides aminés que peut subir l'orge selon les conditions de culture et du milieu. MCELROY et coll. (1949), analysant plusieurs échantillons d'une même variété récoltés sur des sols différents ont pu constater de telles variations. L'influence de la fertilisation et des pratiques culturales sur la composition de l'orge en acides aminés a été étudiée plus récemment par RENNER et coll. (1953) dans le cas particulier des sols déficients en soufre. Il ressort des résultats obtenus et rapportés ici dans le tableau, que la fertilisation soufrée détermine un accroissement important des teneurs en leucine, isoleucine, valine, méthionine et histidine pour l'orge de première année ; pour l'orge récolté après 3 ans, il y a un accroissement d'environ 5 p. 100 des teneurs en leucine et méthionine.

SANDEGREN, EKSTROM et HABERL (1953) ont indiqué par ailleurs que la teneur de l'orge en soufre est de 0,18 à 0,20 p. 100 et inversement proportionnelle à la teneur en protides.

2. — Acides aminés libres

BROWN (1907) a pour la première fois identifié les acides aminés de l'extrait aqueux de malt : acide aspartique, asparagine, tyrosine et leucine. En 1940, URION et LEJEUNE ont évalué à 16 p. 100 de la fraction protéines solubles de l'orge les composés azotés non précipitables, acides aminés et peptides. Jusqu'en 1950 on ne savait pratiquement rien de la nature des acides aminés libres de l'orge. Le développement des techniques analytiques, tout particulièrement dans le domaine de la chromatographie, a été à l'origine de deux intéressants travaux publiés presque simultanément. BISERTE et SCRIBAN (1949-1950 *a*) et SCRIBAN (1951), par chromatographie sur papier, ont identifié à l'état libre

Composition en acides aminés de l'orge, du malt, de l'hordéine et de la bêta-globuline

Acide aminé	Grain entier									Hordéine			Bêta-Globuline			
	P. 100 des Protides (avec N = 16 %)			N de l'acide aminé p. 100 de N total		P. 100 de substance sèche				P. 100 de la Protéine (avec N = 16 %)			P. 100 de la Protéine	(N de l'acide aminé p. 100 de N total)		
						orge broyé	orge perlé	malt	orge broyé							
Alanine	—	—	—	3,4	4,3	—	—	—	0,42	1	0,4	—	6,5	—	4	6,4
Arginine	4,5	4,6	4,21-5,38	9,9	9,7	0,5	—	0,5	0,46	2,9	2,2	2 (3)	2,7	10,3	11	5,4
Acide aspartique	—	—	—	3,4	3,9	—	—	—	0,565	1,2	0	—	8,8	—	1,7	5,8
Cystine-cystéine	—	—	—	0,6	1,8	—	—	—	0,24	—	—	1,6 (5)	9,4	—	0,6	6,8
Acide glutamique	—	—	—	13,6	12,4	3,2	—	2,5	1,99	38,4	43,2	—	17,8	—	13	10,6
Glycine	—	—	—	7,1	5	—	—	—	0,415	—	0	0 (6)	4,2	—	3,3	4,9
Histidine	1,8	1,8	1,53-2	3,5	3,4	0,3	0,21	0,3	0,19	0,5	1,3	1,2 (3)	1,7	3,7	2,6	2,8
Isoleucine	3,8	—	3,40-4,14	2,1	2,2	0,7	0,54	0,7	0,32	—	—	—	3,2	2,9	3,3	2,1
Leucine	5,5	7,65	5,62-6,91	4,7	4,5	1	0,89	0,9	0,645	7	5,7	—	11	4,7	4,6	7,3
Lysine	2,4	2,4	2,66-3,32	4,9	4	0,4	0,28	0,6	0,325	0	0	0 (3)	2,1	4,2	4	2,5
Méthionine	1	—	0,98-1,43	—	0,9	0,2	0,12	0,2	0,15	—	—	2,1 (5)	3,2	0,9	2,1	1,9
Phénylalanine	5,7	5,85	4,38-4,86	2	2,6	0,7	—	0,6	0,47	5,1	5	—	4,7	2,8	3	2,5
Proline	—	—	—	6,3	7,1	—	—	—	0,89	6	13,7	—	13,3	—	3,7	10,1
Sérine	—	—	—	3	3,1	0,5	—	0,5	0,345	—	0	—	4,3	—	4,6	3,6
Thréonine	3,6	3,7	2,64-3,35	3,3	2,7	0,4	0,42	0,4	0,35	—	—	—	5,9	3	2,2	4,3
Tryptophane	1,1	—	—	—	0,9	0,2	—	0,2	0,10	—	—	0,6 (4)	—	1,4	1,4	—
Tyrosine	—	—	—	1,3	1,5	0,2	—	0,2	0,295	3,7	1,7	—	8,5	—	1,4	4,1
Valine	5,1	5,2	3,95-5,01	3,1	3,5	0,7	0,60	0,7	0,455	< 2	0,1	—	9,5	3,8	2,8	7,1
Auteurs	8	12	16	14	15	7	9	7	15	1	2	3-4-5-6	13	10	11	13

1. Kleinschmidt (1907-8). — 2. Osborne et Clapp (1907-8). — 3. Osborne, Leavenworth, Brautlecht (1908-9). — 4. Kraus (1928). — 5. Baerstein (1932). — 6. Patton (1935). — 7. Baumgarten et Coll. (1946). — 8. Jones et Coll. (1948). — 9. Horn, Jones et Blum (1946 à 1949). — 10. Lyman et Kuicken (1949). — 11. Agren (1949). — 12. Kuhnau (1950). — 13. Jensen (1952). — 14. Yungdahl (1953). — 15. Dustin et Coll. (1953). — 16. Renner, Bentley et McElroy (1953).

dans l'orge, le malt et le moût la présence de 19 acides aminés libres, d'asparagine, de glutamine et signalé pour la première fois la présence d'acide γ aminobutyrique et d'acide *a* amino-adipique. L'orge serait particulièrement riche en leucine et alanine libres ; par contre il n'y aurait pas de peptides à l'état libre, certains composants peptidiques identifiés initialement s'étant révélés être des artefacts. Ainsi que l'ont montré LJUNGDAHL et SANDEGREN (1950) l'acide γ aminobutyrique n'est pas un constituant des protéines de l'orge mais existe seulement à l'état libre.

De son côté, MCLEOD (1951) après extraction du grain non germé et séparation par chromatographie sur papier a identifié tous les acides aminés rapportés par BISERTE et SCRIBAN à l'exception de méthionine et histidine. En outre, l'auteur a montré la présence dans le grain non germé de l'asparagine libre dont BISERTE et SCRIBAN n'avaient noté l'apparition qu'à partir du 3e jour de germination.

Faisant également appel aux techniques chromatographiques, PREECE (1952) a identifié 15 acides aminés et amides libres de l'orge, de même que COOK et POLLOCK (1952) ont pu séparer les acides aminés libres présents à côté des sucres dans les jus recueillis après trempage de l'orge.

La mise au point d'une nouvelle technique de chromatographie sur papier a permis enfin tout récemment à HARRIS (1952) puis HARRIS et POLLOCK (1953) d'identifier dans l'orge un nouvel acide aminé, homologue supérieur de la proline : l'acide 1-pipecolinique (acide pipéridine 2 carboxylique).

On doit à LJUNGDAHL et SANDEGREN (1953) d'avoir, par chromatographie sur colonne d'amidon et résines échangeuses d'ions, déterminé quantitativement les acides aminés basiques libres présents dans des extraits aqueux d'orge ou de malt préalablement bouillis dans l'alcool pour inhiber les enzymes protéolytiques. Dans les extraits d'orge dont la teneur en azote ne représente que 2,8 p. 100 de l'azote total du grain seule l'arginine existe en quantités mesurables. Dans les extraits de malt, contenant 17 p. 100 de l'azote total, les 3 acides aminés ont pu être dosés.

3. — **Acides aminés constituants des protéines**

Nos connaissances dans ce domaine, demeurées très fragmentaires pendant plusieurs décades, ont pu être tout récemment précisées par les techniques analytiques nouvelles.

A) **Protéines solubles**

La fraction sel soluble a été étudiée par SCRIBAN par chromatographie sur papier bidimensionnelle de l'hydrolysat, sa composition qualitative est la suivante : alanine, arginine, acide aspartique, cystine, acide glutamique, glycine histidine, leucine, lysine, phénylalanine, proline, sérine, thréonine, tyrosine, valine.

Elle apparaît comme particulièrement riche en arginine et dérivés de la cystine. On ne possède encore aucun renseignement concernant la fraction albumine. A l'heure actuelle, seule la β globuline a été étudiée.

Nous avons reproduit les résultats présentés successivement par AGREN (1949), LYMAN et KUICKEN (1949) et JENSEN (1952).

JENSEN (1952 *a* et *b*) après hydrolyse de la protéine isolée et purifiée, en a effectué l'analyse quantitative par chromatographie sur amidon selon la méthode de MOORE et STEIN ; il ressort des résultats obtenus que la β globuline est caractérisée par sa richesse en cystine et cystéine, en acide glutamique et proline. SANDEGREN (1947) avait montré antérieurement que des 4 globulines de l'orge, la forme β était la plus riche en S (1,94 p. 100).

Les résultats semi-quantitatifs de SCRIBAN (1951) concernant la composition de la β globuline, par chromatographie bidimensionnelle sur papier de l'hydrolysat concluent à une richesse de la protéine en leucine acide glutamique et proline et une richesse relative en dérivés de la cystine.

B) **Protéines insolubles**

a) *Hordéine*

On doit à KLEINSCHMITT (1907), OSBORNE et CLAPP (1907), JOHN et FINKS (1920) les premières indications sur la composition en acides aminés de l'hordéine. En collaboration avec GILBERT (1906) puis CLAPP (1907), OSBORNE a pu identifier et doser 12 acides aminés différents dans un hydrolysat de la protéine, en particulier acide glutamique, proline, phénylalanine et leucine, glycocolle et lysine n'ayant pas été décelés à l'analyse.

Par des techniques de chromatographie bidimensionnelle BISERTE et SCRIBAN (1949), puis SCRIBAN (1951) ont rapporté une étude de la composition quantitative en acides aminés d'hydrolysats d'hordéine ; les résultats obtenus par ces auteurs se différencient des résultats préliminaires obtenus par KENT et MACHEBŒUF (1949) en chromatographie unidimensionnelle. L'hordéine ne contient pas d'hydroxyproline, mais est riche en acide glutamique, proline et leucine, observations qui confirment celles d'OSBORNE et CLAPP ; on note en outre la présence de glycine, thréonine, acide aspartique, sérine, lysine et méthionine.

b) *Glutéline*

La seule étude concernant la glutéline de l'orge est due à SCRIBAN (1951) qui, par les méthodes précédemment énoncées, a donné des renseignements qualitatifs sur sa composition : la protéine est riche en acide glutamique et leucine, comme le sont les glutélines du blé, maïs et riz ; elle est par contre plus pauvre en tyrosine que la gluténine du blé.

Signalons pour terminer une étude récente de GYLLING et von EULER (1952) concernant la teneur en acides aminés des grains d'orge en germination : les chromatogrammes sur papier de l'hydrolysat de mutants verts et blancs de l'orge montrent des différences de composition en asparagine et acide glutamique. D'autre part, l'emploi de méthodes microbiologiques a permis à YEMM et FOLKES (1953) d'établir la composition en acides aminés de préparations protéiques d'origine cytoplasmique et chloroplastique obtenues à partir de feuilles et de grains d'orge à maturité. Aucune différence ne ressort de la teneur de ces fractions en 18 acides aminés différents, si ce n'est pour la lysine.

VI. — VALEUR NUTRITIVE DES PROTIDES DE L'ORGE

Il ressort des observations rapportées précédemment sur la composition en acides aminés que les protéines de l'orge sont pauvres en lysine. Leur valeur nutritive est, dans ce sens, voisine de celle du blé. Cependant après blutage, la farine fine d'orge s'avère un meilleur aliment de croissance pour le porc que la farine de blé extraite à 74 p. 100. Nous ne possédons pas de données récentes sur la valeur nutritionnelle des protides de l'orge, si l'on excepte un travail de KAWADA et coll. (1952) montrant que la digestibilité des grains d'orge pressés serait supérieure à celle des grains de blé pressés.

Quant à la valeur alimentaire des protides de la bière, elle réside principalement, ainsi que l'ont montré BISERTE et SCRIBAN (1954) dans la fraction polypeptidique constituée en partie de certains acides aminés indispensables.

L'AVOINE

I. — **Teneur en protides.**

II. — **Les protéines de l'avoine.**
Caractères de solubilité. Isolement.

III. — **Propriétés physico-chimiques.**
Comportement à l'ultracentrifugation, à l'électrophorèse ; poids moléculaire, point isoélectrique.
a) Protéines « solubles ».
b) Protéines « insolubles ».

IV. — **Les acides aminés de l'avoine.**
1. — Acides aminés du grain et de ses produits de mouture.
2. — Acides aminés constituants des protéines.

V. — **Valeur nutritive des protides de l'avoine.**
1. — Grain et farine.
2. — Facteurs modifiant la valeur nutritive.

I. — TENEUR EN PROTIDES

Grain, produits de mouture et dérivés

Le grain d'avoine entier, y compris les glumes, a une teneur en protides (exprimée en p. 100 de substance sèche) extrêmement variable ; selon les aires de culture, les années de récolte, les variétés, cette teneur peut être dans certains cas inférieure à 8 p. 100 et peut atteindre dans d'autres jusqu'à 19 p. 100. On considère que les teneurs moyennes oscillent entre 11 et 13 p. 100. L'élimination des glumes qui représente une fraction du grain variable mais relativement importante, accroît la teneur en protides de l'avoine comprise alors entre 12 et 20 p. 100.

Comparativement au grain, les glumes sont pauvres en azote. Après analyse de 110 échantillons d'avoine, RICHARDSON (1886) a trouvé une teneur en azote moyenne de 0,4 p. 100. BERRY (1920) a indiqué des teneurs comprises entre 0,15 et 0,5 p. 100 et MORRISSON (1947) donne une teneur calculée de 0,6 p. 100 vraisemblablement trop élevée. Pour un grain de teneur en azote total de 2,29 p. 100 (en substance sèche) HEATHCOTE (1950) a trouvé pour les glumes 0,21 p. 100.

CSONKA (1941) a donné les teneurs en protides de quelques variétés d'avoine de certains produits de mouture et des flocons d'avoine. D'autre part, MOIR (1942) puis KENT-JONES (1947) ont rapporté les résultats d'origines très diverses publiés par plusieurs chercheurs sur la teneur en matières azotées totales du

Teneurs moyennes en protides de l'avoine et de ses produits de mouture
(p. 100 du produit sec avec N × 6,25)

Grain entier	11 à 13	son	8
Grain décortiqué	13 à 15	remoulages	14,1
Glumes.....	1 à 3	semoules	21,5
Mouture entière	12,7 à 20,1	flocons	18,4
Farine (75 % env.)	10,6 à 12,6		

Selon CSONKA (1941), MOIR (1942), KENT-JONES (1947)

grain d'avoine et de ses dérivés. Nous avons réuni dans le tableau suivant les teneurs moyennes qui se dégagent des résultats précités.

Il semble que l'influence des divers facteurs agronomiques sur la teneur en protides de l'avoine soit au moins aussi importante que celle des facteurs génétiques. C'est du moins ce que semblent indiquer les résultats obtenus par Frey (1952) montrant que la teneur moyenne en protides des grains de 14 variétés d'avoine a été en 1949 supérieure de 25 p. 100 à celle observée en 1947.

Middleton et coll. (1954) ont signalé de leur côté que les teneurs en protides de 15 variétés d'avoine d'automne sont indépendantes des rendements, mais fonction de l'habitat.

Heathcote (1950) a de même déterminé la teneur en azote de plusieurs variétés d'avoine poussées sur différents sols et constaté des variations importantes. Le même auteur a établi que les acides aminés et les amides représentaient 85 p. 100 des protides totaux du grain. Si on tient compte, d'une part de l'azote non protéique du grain, d'autre part de la teneur en azote total des protéines de l'avoine qui est de 18,5 p. 100, le facteur permettant de transformer les taux d'azote total en taux de protéines devrait être 5,4.

Schwarze (1950) a proposé une méthode de dosage des protides de l'avoine basée sur la réaction au biuret ; les résultats qu'il a obtenus concordent avec ceux de la méthode classique de Kjeldahl. Comme pour le blé, une telle méthode rendrait possible de nombreux dosages en série.

II. — LES PROTÉINES DE L'AVOINE

Caractères de solubilité. Isolement

Utilisant la méthode d'extraction classique, Osborne (1891-1892) a identifié 3 protéines constituantes de l'avoine :

	p. 100 du grain
Une globuline : l'avénaline	1,5
Une prolamine : la gliadine	1,25
Une glutéline : l'avénine	9,05

Osborne n'a pas identifié de fraction du type albumine ; en outre la glutéline, non isolée quantitativement, est évaluée par différence.

L'existence d'une fraction albumine fut signalée ultérieurement par Luers et Siegert (1924) à côté des 3 autres protéines identifiées par Osborne.

Plus récemment Csonka (1941) a donné les proportions respectives des diverses fractions azotées extractibles par les solvants appropriés.

	p. 100 de l'N total	
Fraction albumine-globuline (ClNa 1 %)	29	
Fraction prolamine (éthanol 70 %)	16	25
Alcool acide	9	
Fraction gluténine (résidu)	40	

Frey (1951 *b*) rapporte les teneurs en N total et N soluble dans l'alcool de diverses variétés. Il constate que la teneur en gliadine est absolument constante et représente les 18 p. 100 de l'azote total, quelle que soit la teneur en protides des diverses variétés.

III. — PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES

a) Protéines « solubles »

La fraction *globuline* de l'avoine a fait l'objet de divers travaux qui, à partir de constatations de nature différente, ont tous conclu à son hétérogénéité. Dès 1924, Luers et Siegert ont isolé 2 globulines se différenciant par leur solubilité dans ClNa 10 p. 100, l'une étant soluble à froid, l'autre à 65°C seulement. Le comportement de la fraction globuline soumise à l'ultracentrifugation a conduit Danielsson (1949) à conclure à l'existence de 2 globulines distinctes α et γ.

b) Protéines « insolubles »

En ce qui concerne les fractions *prolamine-glutéline*, Csonka (1927) a établi que le point isoélectrique de l'avénine se situe à pH 6,45.

Un récent travail de McCalla (1951) a montré que les propriétés électrostatiques des protéines « insolubles » de l'avoine sont fortement altérées par le salicylate de Na. Selon l'auteur, l'action dispersante de ce réactif, comparée avec celle d'autres agents de dispersion, semble dépendre de la formation d'un complexe salicylate-protéine, s'accompagnant d'une chute des propriétés isoélectriques à partir de la zone acide de l'échelle des pH. La séparation électrophorétique des composants des protéines individuelles est amoindrie ou même totalement inhibée par la formation de ce complexe.

La détermination quantitative des groupements aminés totaux et terminaux de l'avénine a conduit Kolessov (1951) à attribuer à la protéine une structure formée par l'association de chaînes polypeptidiques courtes comprenant chacune 9 à 11 acides aminés.

IV. — LES ACIDES AMINÉS DE L'AVOINE

1. — Acides aminés du grain et de ses produits de mouture

Utilisant des méthodes chimiques de dosage, Csonka (1941) a déterminé la teneur en certains acides aminés du grain d'avoine et de ses dérivés. Voici ses résultats, exprimés en p. 100 des protides :

	grain entier	flocons	semoules	remoulages
Arginine	2,1 à 5,8	3,9	3,8	3,5
Cystine	0,7 à 1,8	—	—	—
Histidine	0,6 à 2	1,3	1,2	0,7
Lysine	1,3 à 3,3	1,1	0,6	1,3
Typtophane	0,3 à 0,4	1,5	+	traces
Tyrosine	7,4 à 12	2,9	4,7	6,7

Heathcote (1950) a donné la teneur comparée du grain et des glumes en certains acides aminés, teneur déterminée par des méthodes microbiologiques. Voici les valeurs rapportées par l'auteur (N de l'acide aminé en p. 100 de l'N total) :

	acide glutamique	histidine	lysine	proline
Grain.....	11,6	2,7	3,4	4,9
Glumes	2,2	0,9	2,1	3,8

Les glumes contiennent moins d'acides aminés que le grain ; mais on voit que leur teneur en proline est plus élevée que leur teneur en acide glutamique ; c'est l'inverse qui se produit dans le grain.

La composition quantitative en 12 acides aminés du grain d'avoine a été donnée par BLOCK et BOLLING (1945) à partir des très nombreux résultats analytiques publiés antérieurement à cette date, et obtenus à l'aide de méthodes chimiques très diverses.

Nous avons groupé en un tableau les résultats obtenus depuis 1945 par d'assez nombreux auteurs qui se sont le plus souvent adressés aux méthodes d'analyse microbiologique. Des variations importantes ont été mises en évidence par MACELROY et coll. (1949) dans les teneurs en acides aminés d'une même variété d'avoine cultivée sur des sols différents, présentant des teneurs variables en protides. L'analyse la plus complète du grain d'avoine a été donnée par HEATHCOTE (1950) qui a déterminé les teneurs en 18 acides aminés et amides constituants des protéines. Les résultats n'ont pas mis en évidence de différences importantes de composition entre les diverses variétés examinées. FREY (1952) a dosé certains acides aminés de 14 variétés d'avoine correspondant à 2 récoltes défférentes. Il a constaté que d'une récolte à l'autre la composition quantitative des acides aminés dosés subit des variations importantes. C'est ainsi que les teneurs en lysine, leucine et méthionine se sont accrues respectivement de 47 et 43 p. 100, celle en tryptophane de 12 p. 100 seulement.

A la lumière des résultats les plus récents, il apparaît que le grain d'avoine présente une teneur en tryptophane et en lysine sensiblement égale au blé et supérieure au maïs ; l'avoine semble plus pauvre en histidine et leucine que le blé, mais plus riche en arginine, isoleucine, tyrosine et valine.

Les flocons d'avoine sont non seulement plus riche en azote que le grain entier, mais également en arginine et histidine. Il ne semble pas, contrairement à ce qu'avait observé CSONKA (1932) qu'ils aient une teneur en tryptophane et lysine plus élevée.

Les méthodes microbiologiques de dosage ont été également appliquées par BAUMGARTEN et coll. (1946) puis HORN, JONES et BLUM (1946-49) à l'étude de la composition de la farine d'avoine en acides aminés essentiels. Leurs résultats reproduits dans le tableau ne font pas ressortir de grandes différences par rapport au grain, si ce n'est une diminution de la teneur en arginine et tryptophane.

2. — **Acides aminés constituants des protéines**

A notre connaissance aucun travail n'a fait mention de la composition en acides aminés des protéines de l'avoine type albumines globulines.

On a signalé, en ce qui concerne la prolamine, qu'elle ne contient pas de tryptophane et très peu de lysine.

Il semble que ce soit principalement la fraction glutéline de l'avoine qui ait fait l'objet des principaux travaux dans ce domaine, bien qu'on ne possède sur sa composition aucune donnée récente.

En 1927, LARMOUR a montré que l'avénine était riche en N total basique

Composition en acides aminés de l'avoine, de ses dérivés et de l'avenine

	Grain							Farine		Flocons				Avénine
	P. 100 des Protides (Calculé sur teneur en N de 16 %)						P. 100 de subst. sèche	P. 100 de subst. sèche		P. 100 des Protides			Diff. p. 100 par rap. prot. de l'œuf	P. 100 de Protéine
								Avoine broyée	Meal					
Alanine	—	—	—	—	6,2	—	0,90	—	—	—	—	—	—	2,5
Arginine	6	6,1	—	7,4	6,7	6,79-6,96	0,99	0,7	—	6	5,8	7,4	— 6	8,3 (2)
Acide aspartique	—	—	—	—	3,7	—	0,56	—	—	—	—	—	—	4
Cystine-Cystéine	1,8	—	—	—	1,8	—	0,27	—	—	1,8	1,4	—	— 25	3 (2)
Acide glutamique	—	—	—	—	20	—	2,89	2,9	—	—	—	—	—	18,4
Glycine	—	—	—	—	4,1	—	0,63	—	—	—	—	—	—	—
Histidine	2	1,3	—	2,2	1,5	2,06-2,16	0,23	0,4	0,38	2,2	1,9	2,2	+ 5	2,3 (2)
Isoleucine	5,3	5	—	—	5,1	4,54-4,74	0,80	0,7	0,75	5,6	4,9	4,2	— 30	—
Leucine	8	7	7	7,7	5,7	6,68-6,81	0,87	1,1	1,32	8,3	8,9	6,5	— 10	15
Lysine	3,3	3,3	3,4 / 4,5 (7)	3	3,4	3,59-3,85	0,51	0,6	0,51	3,3	1,9	3	— 54	5 (2)
Méthionine	2,3	1,2	1,2 / 6,4 (7)	—	1,5	1,28-1,38	0,23	0,2	0,19	2,4	2,1	1	— 41	—
Phénylalanine	6,9	4,7	—	4,6	4,8	4,69-4,72	0,72	0,8	—	6,6	5,4	4,6	+ 5	3,2
Proline	—	—	—	—	5,7	—	0,87	—	—	—	—	—	—	5,4
Hydroxyproline	—	—	4,5 (7)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sérine	—	—	—	—	4,5	—	0,69	0,4	—	—	—	—	—	—
Thréonine	3,5	3	—	3,6	3,4	2,92-3,06	0,54	0,4	0,62	3,5	3,2	3,6	— 29	—
Tryptophane	1,3	—	1,2	—	1,3	—	0,20	0,1	—	1,2	1,1	1,3	— 20	1,9 (2)
Tyrosine	4,5	—	—	—	3,2	—	0,50	0,2	—	4,6	4,1	—	+ 2	4,4 (2) / 1,5
Valine	6,5	5,7	—	5,3	6,6	5,41-5,50	0,99	0,7	0,90	6,3	5,5	5,3	— 14	1,8
Auteurs	3	10	13	11	12	14	12	4	9	6	5	8	5	1

1. Abderhalden (1907). — 2. Csonka (1932) dans Winton Winton (1937). — 3. Block et Bolling (1945). — 4. Baumgarten et Coll. (1946). — 5. Mitchell et Block (1946). — 6. Block et Mitchell (1946-1947). — 7. Schweigert (1947). — 8. Jones et Coll. (1948). — 9. Horn, Jones et Blum (1946 à 1949). — 10. McElroy et Coll. (1949). — 11. Kuhnau (1950). — 12. Heathcote (1950). — 13. Frey (1952). — 14. Renner, Bentley et McElroy (1953).

et en N arginine ; pour cette raison, il considère que la protéine se rapprocherait davantage de l'oryzénine du riz que de la gluténine du blé.

On doit à ABDERHALDEN (1907) les premiers résultats relatifs à la composition de la glutéline de l'avoine en acides aminés. CSONKA (1932 et 1937) devait à son tour donner d'autres résultats analytiques qui ont été groupés dans le tableau avec ceux d'ABDERHALDEN.

Autant qu'il soit possible de comparer entre elles des préparations protéiques, surtout lorsqu'il s'agit de glutélines, il semblerait que l'avénine soit plus riche en arginine, cystine et lysine que la gluténine du blé, et de teneur sensiblement équivalente en tryptophane.

V. — VALEUR NUTRITIVE DES PROTIDES DE L'AVOINE

1. — Grain et farine

De même que les autres céréales, l'avoine a pour caractère essentiel d'être pauvre en lysine. Sa prolamine, comme celles du blé et du maïs est déficiente en 2 acides aminés essentiels : tryptophane et lysine, ce qui lui confère une faible valeur nutritive.

MITCHELL et SMUTS (1932), MARAIS et SMUTS (1940) ont montré que la supplémentation de l'avoine par la lysine détermine une augmentation de la croissance. Cette augmentation demeure néanmoins faible par suite de l'intervention de déficiences secondaires non identifiées. MITCHELL et BLOCK (1946) pensent que la seconde déficience des protéines de l'avoine pourrait être la méthionine.

Contrairement à ce que l'on observe avec le blé l'aptitude protidique de la farine fine d'avoine est supérieure à celle de la farine entière selon les observations de TERROINE et VALA (1933). MARAIS et SMUTS (1940) ont admis que les acides aminés de l'avoine sont mieux équilibrés que ceux du blé, du fait que la lysine supplémente le blé in vivo beaucoup plus efficacement qu'elle ne le fait pour l'avoine.

Effectivement les coefficients de rétention azotée déterminés sur le porc par TERROINE et VALA sont de 40 pour la farine fine d'avoine contre 34 pour la farine blanche de blé et la valeur biologique des flocons d'avoine est de 63 alors que celle de la farine blanche oscille autour de 52. On pourrait donc admettre la supériorité protidique de l'avoine sur le blé ; de même MCCOLLUM (1914) était d'avis que, de toutes les céréales, l'avoine était celle complémentant le mieux le blé. Et cependant, CRAMER, LANG, HUBBE et KULIK (1951) ont montré récemment que l'addition de lysine à la farine d'avoine sous forme libre ou sous forme de levure sèche, accroît sa valeur biologique dans de plus fortes proportions que celle d'une farine de blé de même teneur en protides.

Si l'on excepte l'étude comparée présentée par STARE et HEGSTED (1944) sur la valeur nutritionnelle des germes de blé et de maïs et celle des protides de l'avoine, aucun travail précis n'a toutefois été mentionné sur la supplémentation entre les 2 céréales. On considère actuellement que la valeur biologique des protides de l'avoine s'apparente à celle des protides du riz.

2. — Facteurs modifiant la valeur nutritive

La haute valeur protidique de l'avoine fait de cette céréale une matière première de choix dans l'alimentation tant humaine qu'animale. L'industrie alimentaire prépare des produits dérivés de l'avoine qui sont très en faveur, particulièrement dans les pays anglo-saxons. Certaines de ces préparations sont obtenues après avoir fait subir au grain des traitements thermiques plus ou moins intenses et prolongés ; c'est le cas des paillettes d'avoine (drum dried oat meal), de l'avoine expansée au four (oven exploded cereal) et du gruau d'avoine expansé (puffed oats).

Jacquot et coll. (1947) ont fait une étude critique des modifications de la valeur nutritive des céréales ayant subi des traitements thermiques de ce genre. Nous emprunterons à cette étude les faits essentiels concernant l'avoine et les conclusions qui en ont été dégagées.

Les travaux de Stewart et coll. (1943) effectués sur le rat ont comparé l'efficacité de certains produits alimentaires à base d'avoine et celle de l'avoine telle qu'elle est préparée en cuisine ménagère. Les résultats obtenus ont montré que les traitements thermiques moyens (cuisson domestique) ou rapides (séchage sur cylindres, expansion au four) n'altèrent en rien la valeur protidique de l'avoine. Par contre, des procédés tels que l'expansion utilisant de hautes températures pendant un temps plus long, causent de très graves dommages.

Confirmant ces observations, Mitchell et Block (1946) ont apporté des données complémentaires sur la digestibilité, la valeur biologique et la teneur en acides aminés essentiels de protides crus et chauffés, soit de flocons d'avoine, soit d'un mélange avoine-maïs-seigle (puffed oat cereal). Ils montrent que la seule cuisson du « puffed oat » diminue nettement la digestibilité des protides sans altérer la valeur biologique ; l'expansion (gun explosion) par contre provoque un nouvel abaissement de la digestibilité et surtout une diminution considérable de la valeur biologique. La cuisson domestique des flocons diminue un peu la digestibilité et augmente légèrement la valeur biologique.

La diminution de la valeur biologique consécutive aux traitements thermiques poussés ne s'explique pas par la disparition d'un acide aminé essentiel, car la teneur en lysine du produit n'a subi aucune modification au cours du traitement.

D'une façon générale, les traitements thermiques trop intenses sont donc préjudiciables à la valeur nutritive de l'avoine.

Les mêmes conclusions s'appliquent d'ailleurs aux autres céréales.

LE SEIGLE

I. — Teneur en protides.

II. — Les protéines du seigle.

1. — Caractères de solubilité. Isolement.
2. — Propriétés de dispersion.
3. — Facteurs modifiant la solubilité des protéines.
4. — Préparation du gluten de seigle.

III. — Propriétés physico-chimiques.

IV. — Les acides aminés du seigle.

1. — Acides aminés du grain.
2. — Acides aminés constituants des protéines.

V. — Valeur nutritive des protides du seigle.

I. — TENEUR EN PROTIDES

1. — Grain et constituants

Comme le blé et les autres céréales, le seigle présente une teneur variable en protides, conditionnée en partie par les influences saisonnières et le milieu.

La teneur du grain entier varie dans d'assez fortes proportions. Selon les valeurs fournies par KENT-JONES, relatives à diverses variétés de seigle et différentes années de culture, elle est comprise entre les valeurs extrêmes de 6,5 p. 100 à 12,6 p. 100 (N × 5,7). Pour un seigle d'origine suédoise, HAGBERG (1952) indique une teneur de 7,1 p. 100.

Compte tenu des teneurs variables du grain il est difficile de donner une valeur moyenne en ce qui concerne la farine. DYER, TAYLOR et HAMENCE (1942) indiquent des teneurs en p. 100 de matière sèche, allant de 6,84 à 8,92 p. 100 selon le taux d'extraction. La farine étudiée par HAGBERG (1952) extraite d'un seigle suédois, contient 5 p. 100 de protides (extraction à 40 p. 100) et jusqu'à 7,1 p. 100 (extraction de 40 à 70 p. 100).

KIGER (1951) a indiqué les teneurs en protides de diverses farines de seigle de taux d'extraction compris entre 60 et 80 p. 100. Nous les reproduisons ici :

Taux d'extraction	60	70-72	74-76	80-82 p. 100
Protides (p. 100)	6,3	6,8	7,3-9,8	7,7-11,4

De même qu'avec les autres céréales, une élévation du taux d'extraction détermine donc un enrichissement de la farine de seigle en matières azotées.

Le son contient environ 17 à 18 p. 100 de protides et le germe de 40 à 45 p. 100.

II. — LES PROTÉINES DU SEIGLE

1. — Caractères de solubilité. Isolement

Les premiers renseignements relatifs à la composition qualitative et quantitative du seigle en protéines, auraient été fournis par OSBORNE (1910) (voir WINTON-WINTON (1937)). A partir d'une farine entière de seigle à 8,63 p. 100

de protides totaux 4 fractions protéiques, répondant aux caractéristiques classiques de solubilité des protéines végétales, auraient été extraites dans les proportions suivantes :

	p. 100 du grain	p. 100 des protides totaux
Une albumine (leucosine)	0,43	5
Une globuline (édestine)	1,76	20
Une prolamine (gliadine)	4	46
Une glutéline (par différence)	2,44	28

Les valeurs rapportées par PHILLIPS (cf. KENT-JONES 1947) indiquent pour les mêmes fractions protéiques une répartition sensiblement différente soit, exprimée en p. 100 des protides totaux : 8 p. 100 pour l'albumine, 8 p. 100 pour la globuline, 42 p. 100 pour la prolamine et 42 p. 100 pour la glutéline, c'est-à-dire une proportion moindre des protéines « solubles » (albumine + globuline) et une proportion nettement plus importante des protéines « insolubles » (prolamine + glutéline).

Selon les résultats rapportés par KENT-JONES et concernant des farines de seigle anglaises ou allemandes, les fractions azotées extractibles se répartiraient de la façon suivante selon les farines considérées :

	p. 100 de farine	p. 100 de protides totaux
Fraction albumine-globuline (soluble dans SO_4K_2)	0,46 à 1,84	9 à 25
Fraction prolamine (soluble dans alcool)	1,79 à 3,11	36 à 49
Fraction glutéline (soluble dans alcali dilué)	1,67 à 4,03	37 à 49

En s'appuyant sur ces diverses observations, il apparaît difficile de dégager les proportions respectives des diverses fractions protéiques du seigle et en particulier ce que représente la fraction protéines « solubles » par rapport à la fraction protéines « insolubles » type prolamine et gluténine.

a) PROTÉINES « SOLUBLES »

Il ressort toutefois de certains travaux que la solubilité des protéines du seigle dans l'eau ou les solutions salines diluées est plus grande que celle des protéines du même type chez le blé.

KONIG et BARTSCHAT (1923) ont montré en effet qu'une solution aqueuse de SO_4Ca est capable de solubiliser la moitié des protéines du seigle mais, dans le cas du blé, 22 p. 100 seulement de ses protéines. Des nombreuses solutions expérimentées, c'est l'eau calcaire qui a donné les différences les plus marquées entre les 2 céréales.

NEUMANN et PELSHENKE (1943) ont également signalé que les protéines du seigle présentent une solubilité dans l'eau plus grande que les protéines du blé.

HAGBERG (1950) précise, dans le cas des suspensions de farine, que la quantité de matières azotées solubles dans l'eau (exprimée en p. 100 de l'azote total) est 2 fois plus élevée pour le seigle que pour le blé. Selon les conditions d'extraction, l'eau solubilise de 36 à 44 p. 100 des protéines totales de la farine de seigle. HAGBERG a montré en outre que l'addition des sels neutres (Cl Na) diminue la solubilité des protéines dans l'eau, ce qui explique les valeurs notablement plus faibles trouvées par d'autres auteurs lorsque l'extraction de la fraction albumine-globuline a été réalisée par des solutions salines.

b) Protéines « insolubles »

Compte tenu de l'importance de la fraction albumine-globuline du seigle, le fractionnement classique conduit à l'isolement de 2 protéines ou groupes de protéines, l'un soluble dans l'alcool, l'autre dans les solutions alcalines diluées. Certains ont admis que le seigle contenait gliadine et glutéline dans des proportions sensiblement identiques à celles du blé. Il est cependant extrêmement difficile, sinon impossible d'isoler ces protéines sous forme de « gluten » après élimination par l'eau des constituants azotés solubles, comme on peut le faire avec la farine de blé. L'importance du taux de protéines solubles dans l'eau, ainsi que l'a montré Hagberg, réduit considérablement celui des protéines type gliadine et gluténine.

On a supposé (von Fellenberg (1919)) que l'extraction du gluten était rendue impossible par la présence dans le seigle de substances visqueuses. Cependant, même après élimination de ces substances mucilagineuses, on n'est pas parvenu davantage à préparer le « gluten » de seigle ainsi que l'ont montré divers chercheurs : Schullerud (1939), Jorgensen (1943), Kent-Jones et Amos (1947).

c) Protéines du germe

Le germe de seigle serait très riche en protéines du type albumine. Kalning (1917) a évalué à environ la moitié des protéines totales du germe celles qui sont solubles dans l'eau, alors que 1/8 environ seulement sont solubles dans l'alcool.

2. — **Propriétés de dispersion**

La méthode de fractionnement classique d'Osborne donnant des résultats peu reproductibles, on a tenté de trouver une méthode permettant d'extraire théoriquement en une seule opération la totalité des protéines y compris les protéines du type prolamine-glutéline, dites « insolubles ». A cet effet, on a mis à profit l'action solubilisante de certains composés chimiques susceptibles de réaliser une dispersion des protéines.

On n'a pas retenu les composés alcalins, qui comme nous l'avons signalé dans le cas du blé, modifient les protéines de façon irréversible.

Le salicylate de Na, solvant neutre d'emploi satisfaisant dans le cas du blé, s'est révélé un mauvais agent de dispersion dans le cas du seigle. On a fait usage plus récemment avec un certain succès de 2 autres solvants organiques : le naphtyl acétate de Na et le phénylacétate de Na : Harris, Sibbit et Banasick (1948). Utilisés dans l'extraction des protéines de diverses céréales blé, orge et seigle, le naphtyl acétate de Na s'est révélé le plus efficace.

Ce sont surtout les acides qui ont été utilisés dans l'extraction des protéines et on a montré que les acides faibles étaient préférables aux acides forts. Hagberg (1952) a constaté, pour les acides minéraux, que PO_4H_3 était préférable à HCl. Mais c'est principalement aux acides organiques qu'il a été fait appel. Des divers acides organiques passés en revue Hagberg (1952) a trouvé que les acides lactique et formique sont préférables à l'acide acétique. L'acide formique a été utilisé comme agent de dispersion par Cunningham et Anderson (1950). On a également signalé l'emploi des acides lactique, oxalique et citrique dilués.

HAGBERG (1952), préconisant l'acide lactique comme agent de dispersion, a trouvé qu'à pH 5, 58,4 p. 100 des protéines sont solubilisées et qu'à pH 3 on peut extraire 83,7 p. 100 des protéines totales du seigle.

3. — **Facteurs modifiant la solubilité des protéines**

Ainsi que l'ont montré GUILLEMET et coll. pour les protéines du blé, c'est davantage la valeur du pH que la nature de l'anion qui exerce son influence sur la solubilité des protéines du seigle. S'il apparaît selon les résultats de HAGBERG (1952) qu'un accroissement de l'acidité détermine une solubilisation plus poussée des protéines, il convient de noter, ainsi qu'il l'a montré lui-même, que le phénomène est moins accentué avec les protéines du seigle qu'avec celles du blé. Et ceci explique pourquoi une pâte acide convient mieux à la confection du pain de seigle, qu'en panification avec farine de blé.

Un accroissement de la température diminue la solubilité des protéines, plus rapidement avec le seigle qu'avec le blé.

HAGBERG a constaté également que les sels, et en particulier ClNa, diminuent la solubilité des protéines aux pH inférieurs à 5,5, alors qu'au-dessus cette valeur, leur action est inversée et la solubilité augmentée. On augmentera donc la solubilité des protéines en milieu acide si on élimine au préalable les sels par lavage. L'action insolubilisante des sels est en outre d'autant plus marquée que l'acidité est plus élevée.

HAGBERG (1950) a étudié les variations de solubilité des protéines du seigle par addition de sels neutres (ClNa) ou d'oxydants (BrO_3K) en présence de levure. Il a montré que la diminution de solubilité sous l'action des sels était imputable à une précipitation du matériel azoté solubilisé, précipitation plus marquée avec ClNa qu'avec BrO_3K. Le phénomène est d'ailleurs moins important avec les protéines du seigle qu'avec celles du blé.

4. — **Préparation du gluten de seigle**

Alors que l'extraction du « gluten » de seigle par pétrissage d'un pâton sous un filet d'eau constitue une opération quasi irréalisable, la connaissance des propriétés physico-chimiques des protéines du seigle a permis de préparer à partir de farines un produit glutineux assez semblable au gluten de blé.

Les méthodes de préparation publiées par CUNNINGHAM et ANDERSON (1950-1951) d'une part, par HAGBERG (1952) d'autre part, se sont inspirées de principes identiques faisant intervenir d'abord une dispersion des protéines de la farine par un des solvants décrits plus haut. La dispersion protéique ainsi obtenue permet d'éliminer ensuite quantitativement l'amidon après centrifugation. Les protéines sont enfin précipitées de leur dispersion et rassemblées par centrifugation.

CUNNINGHAM et ANDERSON (1950) ont utilisé l'acide formique comme agent de dispersion. HAGBERG (1952) préconise une extraction lactique de la farine entre pH 3 et pH 4,5. La précipitation peut se faire en neutralisant la dispersion jusque vers pH 6,5, point isoélectrique approximatif des protéines. On peut encore précipiter les protéines en salifiant la dispersion acide (1 à 5 g ClNa par 100 cc). On peut utiliser selon HAGBERG, soit des sels neutres ordinaires tels que ClNa, SO_4K_2, $SO_1\ (NH_4)_2$ soit des oxydants tels que le bromate ; dans ce cas on obtient un gluten de bonne qualité.

La précipitation par neutralisation conduit à un gluten sans grande cohésion et difficile à séparer. Au contraire, la précipitation par les sels fournit un gluten ayant les caractéristiques d'un gluten de blé faible, assez ferme mais peu élastique.

La teneur en protéines du gluten ainsi obtenu (N × 5,7) est de 80 p. 100 (en substance sèche).

III. — PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES

En dehors des propriétés particulières de solubilité et de dispersion du matériel protéique du seigle dont il vient d'être parlé, on possède peu de renseignements sur celles concernant les caractéristiques physiques proprement dites des diverses fractions protéiques correspondant aux types définis par OSBORNE.

On sait seulement, selon les travaux de DANIELSSON (1949) que le comportement de la fraction globuline à l'ultracentrifugation aurait permis de conclure à son hétérogénéité et à l'existence de 2 globulines distinctes α et γ.

En ce qui concerne la fraction prolamine du seigle, elle a été considérée par KOLESSOV (1951) comme constituée d'une association de polypeptides à chaîne courte renfermant chacun 11 à 13 acides aminés.

IV. — LES ACIDES AMINÉS DU SEIGLE

1. — Grain

Les premiers résultats publiés concernant la composition du seigle entier en acides aminés ont été rapportés dans le tableau suivant parallèlement aux

Composition en acides aminés du grain de seigle

Acide aminé	p. 100 de protides (N = 16 p. 100)			p. 100 de subst. sèche		
Arginine	6,3 (1) 7 (3)	5,4	5,4	—	0,6	—
Cystine-cystéine	2,2 (2)	—	—	—	—	—
Acide glutamique	—	—	—	—	3,6	—
Histidine	1,6 (1) 1,4 (3)	2,2	2,2	0,22	0,4	0,27
Isoleucine	—	4	—	0,50	0,7	0,49
Leucine	—	6,2	6,7	0,77	1	0,83
Lysine	4,5 (1) 5,1 (3)	3,3	3,3	0,51	0,6	0,41
Méthionine	2,5 (2)	1,1	—	0,15	0,1	0,14
Phénylalanine	—	3	4,5	—	0,7	—
Sérine	—	—	—	—	0,7	—
Thréonine	—	3,9	4	0,38	0,4	0,49
Tryptophane	2,1 (2)	1,3	—	—	0,1	—
Tyrosine	4,9 (2)	—	—	—	0,2	—
Valine	—	5	5	0,62	0,7	0,62
Auteurs	1–2–3	6	8	4	5	7

1 : MILLER (1935). — 2 : LUGG (1938-39). — 3 : TRISTRAM (1939). — 4 : STOKES et Coll (1945). — 5 : BAUMGARTEN et Coll. (1946). — 6 : JONES et Coll. (1948). — 7 : HORN, JONES et BLUM (1946 à 49). — 8 : KUHNAU (1950).

valeurs obtenues récemment par divers auteurs à l'aide des méthodes modernes d'analyse microbiologique.

2. — Protéines

On possède d'autre part peu de travaux récents sur la composition en acides aminés des protéines constituantes du grain de seigle.

Osborne et Clapp (1908) ont dosé les acides aminés de la gliadine du seigle et ont obtenu des teneurs voisines de celles relatives à la protéine correspondante du blé, ce qui les a conduits à admettre que les protéines du blé et du seigle étaient identiques.

Larmour (1927) a analysé comparativement des glutélines de blé et de seigle et mis en évidence des différences importantes de composition quantitative en divers acides aminés.

Il ne semble pas que les techniques modernes d'analyse aient été jusqu'alors appliquées au matériel protéique isolé du seigle comme elles l'ont été pour d'autres céréales. L'importance du seigle dans certains pays déficitaires en blé devrait être une raison suffisante pour entreprendre une étude plus poussée de sa composition en acides aminés.

V. — VALEUR NUTRITIVE DES PROTIDES DU SEIGLE

De teneurs en tryptophane et isoleucine plus faibles que le blé, le seigle possède une teneur en lysine sensiblement égale (0,5 p. 100 de substance sèche). Johnson et Palmer (1934) signalèrent pour la première fois que les protéines du seigle étaient déficientes en lysine.

Bien qu'on ne semble pas avoir étudié systématiquement l'importance de l'action supplétive entre blé et seigle, celle-ci apparaît à première vue comme certaine et expliquerait pourquoi le pain « suédois » présente une efficacité protidique supérieure à celle du pain blanc. C'est du moins ce qui ressort d'expériences déjà anciennes d'Abderhalden, Ewald, Fodor et Rose (1915), (dans Terroine (1933)).

Etudiée comme unique aliment protidique du porc par Terroine et Vala (1933) la farine panifiable de seigle s'avère d'environ 20 p. 100 supérieure à la farine blanche de blé. Un travail de French et Mattill (1935) a comparé la valeur biologique des protéines du seigle du blé entier et du pain blanc.

LE RIZ

I. — Teneur en protides.
1. — Grain, produits de mouture et dérivés.
2. — Influence des méthodes culturales.

II. — Les protéines du riz.
Caractères de solubilité. Isolement.

III. — Propriétés physico-chimiques.
a) Protéines « solubles ».
b) Protéines « insolubles ».
Point isoélectrique, dispersion.

IV. — Les acides aminés du riz.
1. — Acides aminés du grain et de ses dérivés.
2. — Acides aminés constituants des protéines.
3. — Variations dans la composition en acides aminés.

V. — Valeur nutritive des protides du riz.

I. — TENEUR EN PROTIDES

1. — Grains, produits de mouture et dérivés

De toutes les céréales, le riz est sans doute celle dont la teneur en protides présente d'aussi fortes irrégularités selon les variétés et les conditions de culture ou de climat. Aussi serait-il peu significatif de fixer des teneurs moyennes ; nous avons jugé préférable de grouper comparativement en un tableau les valeurs publiées dans la littérature concernant une grande diversité de variétés.

Teneur en protides du grain de riz (*en p. 100*)

Types	Riz paddy	Riz cargo	Riz blanchi	Riz poli	D'après
Honduras.....	7,5	8,6	7,9	8	Dpt. Agr. U.S.A. (1917)
Japon	6,5	7,2	6,5	6,6	Imp. Inst. Bull. (1917)
Américain	—	7,7 — 10,2	—	7,2 — 9,6	Leclerc (1932)
Hongrois	—	9,4 — 12,9	—	8,4 — 13,4	Lozsa (1953)

L'élimination des glumes du riz paddy élève la teneur du grain en protides (riz cargo). Le riz cargo lui-même est plus riche en protides que le riz poli ; le polissage, en effet, élimine certains constituants du grain de grande valeur biologique, entre autres la couche d'aleurone riche en éléments minéraux et protéiques. Selon Leclerc (1932) la perte en protides au cours du polissage varie entre 10,4 et 19,7 p. 100. Lozsa (1953) estime cette perte à 12 p. 100 environ.

Parallèlement aux déterminations effectuées sur le riz commun, Leclerc (1932), a rapporté des résultats concernant les variétés de riz dit « glutineux » : soit 8,63 p. 100 de protides pour le riz glutineux cargo et 8,75 p. 100 pour le

même riz poli. Le terme « glutineux » impliquant que la céréale est riche en composés azotés du type gluten, n'est guère heureux. Disons qu'il n'a aucun rapport avec la teneur en protides ou en gluten et le riz dit « glutineux » n'est pas obligatoirement plus riche en protides que le riz commun. LECLERC a trouvé en effet que 3 échantillons de riz commun étaient plus riches en protides que les riz glutineux examinés.

En fait, « glutineux » veut exprimer que les grains de telles variétés deviennent après cuisson plus gélatineux et collants que les riz ordinaires. Un tel riz entre dans la composition de certaines préparations alimentaires au Japon.

Quant aux produits de mouture du grain de riz, nous reproduisons dans le tableau ci-dessous les teneurs indiquées par KENT-JONES (1947) et JACOBS (1951) concernant 2 types de riz .

Teneurs en protides des produits de mouture du grain de riz
(en p. 100)

	Type Honduras	Type Japon
Farine première de blanchiment	8,2	6,3
Farine seconde	7,9	—
Déchets	7,7	6,5
Riz de brasserie	7,8	6,6
Glumes	2,6	2,7
Son	13,4	12,8
Polissures	12,8	11,4

2. — Influence des méthodes culturales

Si, comme c'est le cas pour toutes les céréales, la variété a une influence incontestable sur la teneur en protides, il convient de noter en ce qui concerne le riz, et mises à part les conditions climatiques, l'importance des méthodes de culture et particulièrement de l'irrigation.

SREENIVASAN et SADASIVAN (1942) rapportent les teneurs en protides suivantes concernant des riz de diverses variétés cultivés : *a*) soit à sec (sans irrigation) ; *b*) soit avec irrigation ; *c*) soit enfin avec irrigation et transplantement.

	a) sec	b) humide	c) transplanté humide
Protides % . .	7,87 à 8,35	9,06 à 9,61	10 à 10,77

Ces chiffres mettent en lumière que le riz irrigué, quelle que soit la variété, est plus riche en protéines que le riz cultivé sans irrigation.

LOZSA (1953) a signalé d'autre part que le riz récolté sur des sols alcalins présentait une teneur élevée en protides alors que celui récolté sur des terrains argileux était pauvre en protides. Par contre on n'a pas constaté de variations sensibles de cette teneur entre les récoltes d'années différentes.

L'influence conjointe du milieu et de la variété ressort également des travaux de McCALL et coll. (1953) qui ont constaté des variations de la teneur en protides de la farine et du son de riz. De même BALASUBRAMANIAN et coll. (1952) ont indiqué des variations sensibles de la richesse du grain de riz en constituants azotés entre diverses variétés.

II. — LES PROTÉINES DU RIZ

Caractères de solubilité. Isolement

On doit à ROSENHEIM et KAJIURA (1908) le premier travail important sur les protéines du riz ; ces auteurs ont identifié seulement de faibles quantités d'albumine et globuline et ont isolé à l'état de traces une protéine soluble dans l'alcool. La presque totalité des protéines du grain solubles dans les alcalis dilués répondait aux caractéristiques des glutélines. On lui donna le nom d'*oryzénine*.

SUZUKI, YOSHIMURA et FUGI (1909) ont isolé à partir du riz blanc et du son de riz une fraction soluble dans les solutions salines, apparentée aux globulines, représentant respectivement 17 p. 100 du riz et 1,37 p. 100 du son. Les mêmes auteurs ont évalué à 0,11 p. 100 la fraction prolamine du riz poli, et à 1,16 p. 100 celle du son.

Les résultats publiés plus tard par OSBORNE ont confirmé la nature des protéines constituantes tout en attribuant aux fractions albumine et glutéline des proportions différentes de celles signalées par ROSENHEIM et KAJIURA, Voici la composition du riz exprimée en p. 100 du grain, en diverses protéines. selon OSBORNE :

Albumine	1,62 à 3,20
Globuline	0,47
Prolamine	0,48 à 0,5
Oryzénine	1,24 à 1,96

Des travaux ultérieurs ont cependant confirmé que la fraction glutéline était quantitativement la plus importante. L'extraction de l'oryzénine a fait l'objet de travaux de KONDO et HAYASHI (1926 *a*) puis de JONES et CSONKA (1927). Ces derniers ont préparé la fraction glutéline à partir du riz poli en solubilisant la protéine dans NaOH 0,2 p. 100 et en précipitant la dispersion obtenue par $SO_4(NH_4)_2$ 3 p. 100.

Des résultats plus récents concernant l'importance quantitative des diverses fractions protéiques du riz, définies par leurs propriétés de solubilité, ont été publiés par KICK (1941). Ils concernent le riz entier et le riz blanchi et sont exprimés en p. 100 de l'azote total du grain.

	Riz entier		Riz blanchi	
Fraction *albumine-globuline* (soluble dans NaCl 1 %)	13,82		11,51	
Fraction *prolamine* (soluble dans alcool 60 %)	3,66		5,75	
Fraction *glutéline* (soluble alcool acide)	3,98	48,2	5,33	46,2
Soluble alcali 0,1 %	44,22		40,85	
Fraction *résiduelle*	25,90		27,60	

L'étude la plus récente et la plus complète dans ce domaine a été présentée par LOZSA (1953) ; elle indique la composition en protéines de diverses variétés de riz hongrois et américains. Voici, groupés en un tableau, les résultats publiés ar LOZSA.

Devant la disparité des résultats publiés, on ne peut que souligner une nouvelle fois l'incertitude qui subsiste, pour le riz comme pour les autres céréales,

Composition en protéines du riz (en p. 100 du grain)

Riz	Protides totaux	Albumine	Globuline	Prolamine	Oryzénine	Rapport Albumine	Globuline	Prolamine	Oryzénine
Hongrois									
cargo	9,4 – 12,9	0,23–0,45	0,57–1,07	0,69–1,24	7,20– 8,92	4	8	8	80
poli	8,4 – 13,4	0,05–0,28	0,58–1,22	0,41–1,22	6,56–10,34	2	8	8	82
commun	7,9 – 9,1	0,08–0,26	0,63–0,70	0,44–0,72	6,40– 7,35				
Américain									
poli	6,7 – 8	0,03–0,20	0,60–0,70	0,44–0,50	5,20– 6,52	2	9	6	83

sur la nature biochimique de la fraction glutéline. Tous les auteurs s'accordent néanmoins sur le fait qu'elle constitue l'essentiel du matériel protéique du grain, et les teneurs indiquées traduisent la diversité des méthodes utilisées pour sa détermination quantitative. Il semble également bien établi que les fractions albumine, globuline et prolamine sont présentes dans le riz mais en très faibles quantités.

JAGAT et coll. (1953) ont rapporté une étude indiquant les modifications subies par les constituants protéiques des grains de riz au cours de leur altération par les moisissures. Dans les premiers stades de l'altération on observe un accroissement important des constituants azotés de l'extrait hydrosoluble. Le taux d'azote aminé, faible à l'origine, augmente considérablement dans les derniers stades. Le taux de glutéline diminue, à mesure que progresse l'altération.

III. — PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES

Une étude physico-chimique sur la spécificité des protéines de diverses variétés de riz a été présentée par TADOKORO, NAKAMURA et WATANABE (1926) ; on a de même tenté d'établir certaines différences entre les diverses protéines en fonction de leurs propriétés physico-chimiques (TADOKORO, ITO et WATANABE (1926)).

a) PROTÉINES « SOLUBLES »

On ne possède aucune indication sur les propriétés de la fraction *albumine*, qui constitue la fraction protéique la plus faible à la lumière des divers travaux précédemment énoncés.

En ce qui concerne la fraction *globuline*, il semblerait qu'elle ne corresponde pas à une protéine homogène. JONES et GERSDORFF (1927) font mention de 2 globulines distinctes, extraites du riz poli, l'une coagulant à 74°C, l'autre à 90°C. KONDO et ITO (1930) auraient isolé également 2 globulines apparemment différentes par leur composition en certains acides aminés.

b) PROTÉINES « INSOLUBLES »

Les renseignements plus nombreux relatifs aux propriétés physico-chimiques des protéines du riz, concernent la fraction *glutéline*, quantitativement la plus importante. Nous n'avons toutefois relevé aucune référence bibliogra-

phique relative au poids moléculaire, mais d'assez nombreuses études sur la détermination du point isoélectrique : KONDO et HAYASHI (1926 *b*) délimitent le point de floculation optimum, puis l'influence des sels (KONDO, HAYASHI et MATSUSHITA 1926). En 1928, KONDO et HAYASHI apportent leurs observations sur le point isoélectrique de la protéine après que JONES et CSONKA (1927) eurent établi qu'il se situerait aux alentours de pH 6,45 pour la protéine extraite du riz poli.

Un travail sur la dénaturation des protéines du riz a été présenté par TADOKORO et WATANABE (1928).

Enfin, et bien que les protéines insolubles du grain de riz, très pauvres en prolamine, ne présentent aucunement le caractère glutineux des protéines correspondantes du blé, on a tenté de les extraire en mettant à profit l'action dispersive de certains réactifs. C'est ainsi que TENG-WU (1944) a étudié la peptisation des protéines du riz par les acides et les sels organiques et que plus récemment, CUNNINGHAM et ANDERSON (1950) sont parvenus à disperser le « gluten » du riz dans l'acide formique 0,01 M.

IV. — LES ACIDES AMINÉS DU RIZ

1. — Acides aminés du grain et de ses dérivés

La présence de phénylalanine, tyrosine et tryptophane dans les hydrolysats des protéines du riz fut signalée pour la première fois par ABDERHALDEN en 1907 puis 1914 : ABDERHALDEN et GIGON (1907) et ABDERHALDEN (1914). OSBORNE, VAN SLYKE, LEAVENWORTH et VINOGRAD (1915) puis JODIDI(1927) étudièrent la composition azotée du grain de riz ou de ses protéines comparativement à celle de certaines autres céréales.

Une étude plus récente de KICK (1941) a indiqué les teneurs en cystine, tryptophane, arginine, histidine et lysine du riz entier, du riz poli, du son de riz et des polissures ; en voici les résultats exprimés en mg de l'acide aminé considéré par gramme d'azote total du produit.

	Riz entier	Riz poli	Son de riz	Polissures
N total %	1,23	1,02	2,14	1,98
Cystine	73	72	64	71
Tryptophane	60	65	45	54
Lysine	212	275	207	224
Arginine	223	247	161	138
Histidine	52	58	42	36

Les teneurs en tryptophane arginine et histidine du riz entier ou poli sont sensiblement identiques à celles du blé et du maïs. Comparé au blé, le riz est plus pauvre en lysine ; de même et selon OGATA et KIKUO (1952), sa teneur en méthionine (en p. 100 des protides) est de 1,74 alors que celle du blé est 2,28.

Les résultats les plus récents et les plus complets sur la composition du riz en acides aminés ont été obtenus à l'aide des méthodes microbiologiques d'analyse ; nous les avons rassemblés en un tableau. Le travail de BALASUBRAMANIAN et Coll. (1952) portant sur 6 variétés, fait ressortir des variations de compo-

sition assez sensibles. Une diminution de la teneur en lysine de certaines farines a été constatée au cours de la conservation.

Composition en acides aminés du grain de riz

	P. 100 des Protides (Calculé sur la base de 16 % en N total)					Écart p. 100 par rapt. Prot. œuf	P. 100 de substance sèche	
	Riz paddy	Riz blanchi			Riz cargo	Riz blanchi	Riz blanchi	Riz cargo
Arginine	4,3	7,2	7,2	8,7	8,8	—	+ 13	—	—
Cystine-Cystéine ..	—	1,4	1,4	—	—	—	— 42	—	—
Glycine	—	—	10,3	—	—	—	—	—	—
Histidine	1,7	1,5	1,5	2,3	2,3	1,4-2	— 29	0,18	0,124-0,184
Isoleucine.....	4	5,1	5,3	5,1	—	5,5-6,7	— 34	0,34	0,45-0,74
Leucine	6,2	7,7	9	7,7	8,6	7,4-9,4	— 2	0,68	0,60 -0,89
Lysine	4,2	3,2	3,2	2,8	2,8	3,8- 4,4	— *56*	0,22	0,309-0,436
Méthionine....	1,3	3,4	3,4	—	—	1,4 -4,5	— 17	0,10	0,168-0,240
Phénylalanine .	5,6	6,3	6,7	4,6	4,8	4,3 -5	+ 6	—	0,344-0,529
Thréonine	3	3,9	4,1	3,6	3,6	—	— 16	0,28	—
Tryptophane ..	1,3	1,3	1,3	1,3	—	1,13 (1) 1,15-1,5	— 13	—	0,095-0,135
Tyrosine	—	5,6	5,6	—	—	—	+ 24	—	—
Valine	5	6,4	6,3	6,3	6,3	5,6 -7,8	— 14	0,50	0,46-0,70
Auteurs	3	2	3	5	7	8	4	6	8

1. Greene et Black (1944). — 2. Block et Bolling (1945). — 3. Block et Mitchell (1946-47). — 4. Mitchell et Block (1946). — 5. Jones et Coll. (1948). — 6. Horn, Jones et Blum (1946 à 49). — 7. Kuhnau (1950). — 8. Balasubramanian et Coll. (1952).

A notre connaissance, aucun travail n'a été publié concernant les acides aminés libres du grain de riz.

2. — Acides aminés constituants des protéines

Nous n'avons pas davantage relevé de résultats analytiques importants et récents ayant trait à la composition en acides aminés des diverses protéines du riz, même en ce qui concerne l'oryzénine.

Les analyses d'Osborne et coll. (1915) concernant cette protéine mentionnent des teneurs de 8,8 p. 100 pour l'arginine, de 3,2 p. 100 pour l'histidine et de 4,1 p. 100 pour la lysine. Csonka (1932) a donné par ailleurs les valeurs suivantes pour la glutéline extraite du riz : cystine 1,2 p. 100, tryptophane 1,8 p. 100 et tyrosine 5,8 p. 100.

Tadokoro, Nakamura et Watanabe (1925) auraient mis en évidence certaines différences de composition entre l'oryzénine des riz dits glutineux et celle des riz non glutineux. La protéine des riz glutineux contiendrait davantage de groupements —COOH et moins de groupements—NH_2 que celle du riz non glutineux.

D'autre part, Larmour (1927) en comparant les glutélines de diverses céréales, a trouvé que l'oryzénine contient le pourcentage le plus élevé en N

arginine et N basique. Les teneurs correspondantes de la glutéline de l'avoine seraient voisines de celles de l'oryzénine, celle du blé et du maïs étant plus faibles.

3. — **Variations dans la composition en acides aminés**

De même que pour les autres céréales, certains facteurs génétiques et agronomiques sont susceptibles de modifier la composition quantitative des protéines du riz en acides aminés. C'est ainsi que KICK (1941) a constaté des différences de composition selon les variétés de riz ; il a noté en outre que le traitement par certains engrais déterminait un accroissement de la teneur en certains acides aminés. Nous avons rapporté plus haut les variations constatées par BALASUBRAMANIAN et coll. (1952) entre diverses variétés, semblant affecter en particulier la teneur en tryptophane.

V. — VALEUR NUTRITIVE DES PROTIDES DU RIZ

De nombreux chercheurs se sont préoccupés de déterminer la valeur des constituants protéiques du riz et de ses sous-produits : TAKAHASHI et SATO (1913) pour le riz poli, MCCOLLUM et SIMMONDS (1917), OSBORNE et MENDEL (1918), MAYNARD, TRONDA et CHEN (1923), MITCHELL et VILLEGAS (1923) pour le son de riz, MITCHELL et CARMAN (1924) et (1926), MORGAN et coll. (1931), SWAMINATHAN (1937), BASU et BASAK (1937), FORD (1941), ce dernier comparativement à la valeur nutritive d'autres céréales (maïs, seigle, orge). Signalons également l'intéressante étude récemment publiée par GRIST et coll. (1953).

L'influence qu'exerce la variété sur la composition en acides aminés affecte également la valeur alimentaire. SREENIVASAN (1942) a déterminé la valeur nutritive des constituants protéiques de diverses variétés de riz. SREENIVASAN et SADASIVAN (1942) ont comparé la valeur biologique de 3 variétés de riz cultivés dans diverses conditions parallèlement à leur teneur en protides. La valeur biologique du riz irrigué et semé se situe entre celles du riz transplanté et du riz irrigué.

KICK (1939-40) a montré que les protéines du riz étaient déficientes en lysine, observations confirmées par MITCHELL et BLOCK (1946). La comparaison de la composition quantitative du riz en acides aminés par rapport aux protéines de l'œuf telle que ces derniers auteurs l'ont établie (voir tableau) fait nettement ressortir que la lysine est l'acide aminé limitant.

Le travail de KICK nous apporte en outre certaines précisions sur la valeur biologique du riz comparée à celle de ses sous-produits. Cet auteur a trouvé en effet que les protéines du riz entier et du riz poli ont une valeur biologique plus faible mais une digestibilité plus élevée que celles du son et des polissures. Des expériences sur rats ont montré que l'addition de cystine, méthionine et lysine améliore la valeur nutritionnelle des protéines du riz paddy et du riz poli ; toutefois, l'addition de tryptophane n'entraîne pas d'amélioration supplémentaire. Quant à la valeur biologique du son et des polissures elle n'est pas améliorée par addition de cystine.

NARAYANA et SWAMINATHAN (1953) ont, par analyse chimique et par la méthode biologique de la croissance du rat, déterminé les pertes de valeur nutritive subies par les protides du riz selon qu'il est plus ou moins broyé.

A la lumière des nombreux travaux cités il apparaît que le riz, en dépit de sa teneur relativement faible en protides, possède une valeur biologique plus élevée que celle de la plupart des céréales, y compris le blé. C'est l'opinion exprimée par JONES, CALDWELL et WIDNESS (1948) bien que BLOCK et MITCHELL (1946-47) considèrent que l'apport en lysine constitue un facteur limitant. Signalons à ce sujet une étude sur l'amélioration nutritionnelle du riz blanc due à KICK et WILLIAMS (1945). Plus récemment, SURE, EASTERLING et coll. (1953) ont montré que les protéines du riz broyé supplémentent efficacement les protéines du blé et du maïs. Certains agents de blanchiment sont susceptibles de fausser totalement la valeur alimentaire des protéines des céréales ; BENTLEY et coll. (1948) ont en effet signalé que le traitement de diverses farines de céréales, dont le riz, par le trichlorure d'azote provoque chez le chien l'hystérie à un degré élevé. Le facteur toxique responsable serait un complexe oxydé de la méthionine.

Il semble que les protéines du riz, pauvres en lysine, aient une teneur en tryptophane sensiblement plus élevée que le blé et le maïs et une valeur biologique supérieure à celle des autres céréales. Il convient toutefois, lorsqu'on parle d'efficacité protidique, de tenir compte des conditions dans lesquelles le riz est consommé : soit qu'il ait été dépourvu de ses enveloppes externes et réduit à l'endosperme, soit que les enveloppes contenant le complexe vitaminique du groupe B soient comprises dans la ration alimentaire.

Il résulte par ailleurs de divers travaux que certains traitements thermiques pratiqués dans la préparation de spécialités alimentaires à base de riz telles que le « puffed-rice » (riz « expansé » à la vapeur) sont préjudiciables à sa valeur nutritive. MORGAN et KING (1926) puis MORGAN et coll. (1931) ont mis en évidence que les traitements à sec et les techniques d'expansion déterminent une baisse légère de la digestibilité et une diminution très marquée des valeurs de croissance alors que la cuisson à l'eau bouillante n'altère pas l'efficacité protidique. Plus récemment, ACHARYA et coll. (1942) ont montré que le rôtissage très particulier (parching) pratiqué couramment aux Indes sur le riz bouilli détermine un amoindrissement de la valeur alimentaire du produit.

LE MAIS

I. — **Teneur en protides.**
1. — Grain, produits de mouture et dérivés.
2. — Répartition des protides dans le grain.

II. — **Les protéines du maïs.**
1. — Caractères de solubilité. Isolement.
2. — Facteurs modifiant la solubilité.
3. — Propriétés de dispersion.
4. — Répartition anatomique et biologique.
5. — Influence des facteurs génétiques et agronomiques.

III. — **Propriétés physico-chimiques.**
Comportement à l'ultracentrifugation, à l'électrophorèse.
Poids moléculaire, point isoélectrique.

IV. — **Les acides aminés du maïs.**
1. — Acides aminés du grain et du germe.
2. — Acides aminés libres.
3. — Acides aminés constituants des protéines.
4. — Variations dans la composition en acides aminés.

V. — **Valeur nutritive des protides du maïs.**
1. — Grain et germe.
2. — Facteurs modifiant la valeur nutritive.

I. — TENEUR EN PROTIDES

1. — Grain, produits de mouture et dérivés

Le grain et les épis contiennent environ 55 p. 100 de l'azote total de la plante : Latshaw et Miller (1924) et Kelley, Hunter et Sterges (1946). Dans un même épi les grains du milieu paraissent plus riches en azote que ceux des extrémités.

Comme c'est le cas pour la plupart des céréales, la teneur en protides du grain de maïs est variable. Cette variation est fonction non seulement de l'espèce considérée (Bushey (1924), Segal (1933)) et du degré de maturité du grain (Spitzer, Carr et Epple (1919), Bushey (1924)), mais aussi de nombreux facteurs de nature agronomique : région de culture, conditions climatiques, type de sol, apport d'engrais, etc... (Whitson, Wells et Vivian (1902), Widstoe (1903), Greaves et Nelson (1925), Fraps (1931), Doty, Bergdoll et Miles (1943)).

Parmi les études les plus récentes signalons celles de Bennett et coll. (1953), de Sauberlich et coll. (1953 *a*), de Prince (1954), concernant l'influence de la fertilisation azotée sur la teneur en protides du grain, ainsi qu'un travail de Bressani et coll. (1953) constatant que les grains de maïs récoltés à basse altitude subissent un accroissement de leur teneur en protides.

Il est difficile de fixer une teneur moyenne pour une céréale croissant dans

des aires aussi disparates, les facteurs d'ordre génétique étant étroitement associés aux facteurs agronomiques. On a en effet noté des variations échelonnées entre 6 et 16 p. 100. SAUBERLICH et coll. (1953 *a*) ont trouvé pour 19 échantillons des teneurs comprises entre 6,8 et 12 p. 100. FLYNN et coll. (1954) ont publié récemment les valeurs suivantes : de 8,3 à 13,3 p. 100 (moyenne 9,9 p. 100) pour 13 variétés à « faible » teneur en protides, de 12,8 à 15,4 p. 100 (moyenne 14,3 p. 100) pour 15 variétés à teneur élevée.

Les teneurs les plus fréquentes sont de l'ordre de 8 à 11 p. 100. BRESSANI et coll. indiquent le chiffre moyen de 9,5 p. 100 après analyse de 24 variétés différentes.

Le dérivé du maïs le plus fréquemment utilisé dans les préparations alimentaires, le « corn meal », a une teneur moyenne en protides de 9,1 p. 100 (Nutritionnal Charts) ; la teneur du « pop. corn » est de 10,7 p. 100, celle du maïs blanc concassé 8,5 p. 100.

WOODS (1907) et WINTON, BURNETT et BORNMANN (1915) ont donné les teneurs en protides de divers produits de mouture de maïs (N × 6,25).

Maïs blanc	9,12-10,8 %
Maïs jaune	10,7
Grosses semoules	8,78
Fines semoules	8,66
« Meal cream »	7,85
Farine	6,78-7,1
Germe	16,62
Germe délipidé	20,22
Produit avant travail	11,70
Son	8,43

SHOWALTER et CARR (1922), JODIDI (1925), BREWSTER et ALSBERG (1919) ont présenté des résultats fragmentaires sur les diverses formes d'azote du grain de maïs. Ces résultats ont été rassemblés et présentés par CANNON, MAC MASTERS, WOLF et RIST (1952) parallèlement à ceux de HAMILTON, NEVENS et GRINDLEY (1921). L'azote non protéique représenterait en moyenne 9 à 10 p. 100 de l'azote total. WOHLBIER et WEBER (1940) préconisent un traitement à l'acide formique à pH 3 pour séparer les substances protéiques des non protéiques, insolubles dans ces conditions.

2. — Répartition des protides dans le grain

Dès 1894, VORHEES a donné les teneurs en protides de certaines régions anatomiques du grain : 12,2 p. 100 pour l'endosperme, 19,6 p. 100 pour le germe et 6,6 p. 100 pour les glumes (en p. 100 de substance sèche). HOPKINS, SMITH et EAST (1903 *a* et *b*) ont, les premiers, étudié la répartition des constituants biochimiques dans le grain (protides, lipides, glucides, minéraux) sur un matériel disséqué à la main. Plus récemment EARLE, CURTIS et HUBBARD (1946) ont, par dissection de 11 échantillons de maïs, séparé endosperme, germe, enveloppes et tip cap ; d'après leurs résultats l'endosperme contient de 74,3 à 77,6 p. 100 des protides totaux, le germe de 19,3 à 22,9, les glumes de 2 à 2,22 et tip cap de 0,8 à 0,87.

Enfin, le travail le plus récent concernant la répartition des protides dans les diverses régions anatomiques du grain de maïs disséqué à la main, vient d'être présenté par HINTON (1953). Nous avons reproduit le tableau publié par l'auteur.

Répartition des protides dans le grain de maïs

	% du grain	Teneur en protides (N × 6,25)		Proportion des protides totaux du grain
		p. 100	p. 100 g de grain	
Péricarpe	6,5	3	0,2	2,2
Couche aleurone ..	2,2	19,2	0,4	4,7
Endosperme 1	3,9	27,7	1,1	11,9
Endosperme 2	58,1	7,5	4,4	48,2
Endosperme 3	17,6	5,6	1,-	10,9
Embryon.....	1,1	26,5	0,3	3,2
Scutellum	10,6	16	1,7	18,9
Grain total	100	9	9,1	100

Ces résultats sont en bon accord avec ceux de EARLE et coll. (1946). Par comparaison avec le blé, la couche d'aleurone, beaucoup moins importante que dans le blé, contient une proportion plus faible des protides du grain ; le scutellum, beaucoup plus important, contient une proportion plus grande, enfin le péricarpe est moins riche en protides que celui du blé.

II. — LES PROTÉINES DU MAIS

1. — Caractères de solubilité. Isolement

Appliquant au maïs les méthodes d'extraction utilisées pour d'autres céréales, OSBORNE (1897) définit à partir d'un matériel à 9,98 p. 100 de protides, les fractions protéiques suivantes dont l'une, soluble dans les solutions salines diluées, donc apparentée aux globulines, est séparable en 3 types se différenciant par certaines propriétés.

	En p. 100 du grain
1. *a*) Une maïsine caogulable	0,25
b) Une édestine non coagulable.....	0,10
c) Une globuline très soluble	0,04
2. Des protéoses solubles dans l'eau.....	0,06
3. Une prolamine, la *zéine* soluble dans l'alcool 92-93 %.....	5
4. Une glutéline soluble dans les alcalis dilués.....	3,5
5. Une fraction insoluble résiduelle.....	1,03

Aucune fraction répondant aux caractéristiques de solubilité des albumines n'est signalée.

Les résultats postérieurs présentés par OSBORNE et MENDEL (1914 *a*) indiquent que 22 p. 100 des protides totaux du grain sont extractibles dans ClK 10 p. 100, 41 p. 100 dans l'éthanol 90 p. 100, 31 p. 100 dans KOH 0,2 p. 100 et 6 p. 100 restant dans l'insoluble. L'opinion alors admise par OSBORNE et ses élèves était que le maïs ne contenait pas d'albumines vraies, opinion qui fut partagée plus tard par ZELENY (1935) qui assimilait aux protéoses la fraction soluble dans l'eau.

D'autres travaux toutefois purent mettre en évidence la présence des 4 fractions protéiques classiques rencontrées chez d'autres céréales : albumine, globuline, prolamine et glutéline ; citons à ce sujet SHOWALTER et CARR (1922),

STAKER et GORTNER (1931), WALSH (1937), DOTY, BERGOLL, NASH et BRUSON (1946). Une étude récente sur le grain de maïs due à CANNON, MCMASTERS, WOLF et RIST (1952) a groupé en un tableau la nature et le pourcentage des diverses fractions protéiques séparées à partir du maïs par divers chercheurs.

Nous reproduisons ici l'essentiel de ces résultats :

Fractions protéiques extraites du grain de maïs
p. 100 de l'N total en :

Albumine	Globuline	Prolamine	Glutéline	Insoluble	Références
	22	41	31	6	*Osborne-Mendel (1914)*
	21,6	29,4	42,8		*Spitzer et Coll. (1919)*
3-8,5	1,3-5,4	27,5-56,6	36-57,2		*Showalter-Corr (1922)*
3,3	16,4				*Staker-Gortner (1931)*
—	7,8	42	16,2	27	*Zélény (1935)*
—	16	27	48		*Csonka (1939)*
10,8-12,6	12-12,8	20,5-23,3 27,9-36,4	43,4-48,4	10,5-12,7	*Doty et Coll. (1946)* *Frey (1951)*

A en juger par l'extrême diversité des résultats obtenus, il ne semble pas que l'on soit parvenu à élucider de façon précise la composition du maïs en protéines. Il semble, comme l'a fait remarquer CSONKA (1939) que la quantité de chaque fraction obtenue dépende de la méthode d'extraction, de la nature et de la concentration du solvant utilisé. Les opinions semblent assez diverses quant à la nature des protéines solubles dans les solutions salines diluées. En ce qui concerne les protéines « insolubles » prolamine et glutéline, on ne sait pas de façon nette s'il existe une délimitation précise entre les diverses protéines constituantes ou s'il y a une gamme continue de protéines différentes allant du type prolamine au type glutéline alcalino-soluble.

2. — Facteurs modifiant la solubilité

En faisant appel à des méthodes d'extraction inspirées d'OSBORNE, la séparation des différentes fractions protéiques du maïs est loin d'être un procédé satisfaisant et quantitatif. Il n'en reste pas moins que les variations considérables qui ressortent des résultats obtenus concernant le pourcentage de ces diverses fractions sont imputables pour la plus grande part à des variations, en apparence relativement peu importantes, dans les techniques d'extraction utilisées.

Les facteurs susceptibles d'affecter la solubilité des fractions protéiques sont nombreux : finesse de la mouture destinée à être extraite, rapport entre le poids de matériel et le volume du solvant, durée et température d'extraction, concentration et nature des solutions salines utilisées : HOPKINS et BURNS (1929), HOPKINS (1930), SECCHI (1942), NAGY, WEIDLEIN et HIXON (1941).

FOSTER et coll. (1950) ont très bien mis en évidence l'influence de la nature de l'agent d'extraction utilisé ; travaillant sur une mouture entière de grains de maïs, ils ont observé qu'à 2°C, l'eau extrait 11 p. 100 des protéines totales, ClNa 5 p. 100 : 22 p. 100 ; tampon carbonate pH 10 : 30 p. 100 ; tampon phosphate pH 7,8 : 20 p. 100 ; à température ordinaire l'éthanol aqueux 73 p. 100 extrait 40 p. 100 des protéines totales. L'ion $PO_4^{=}$ a une action insolubilisante.

Dans le cas particulier de la zéine, les grandes variations signalées seraient

le plus souvent attribuables aux conditions d'extraction ; la concentration de l'alcool aqueux utilisé varie en effet selon le auteurs de 70 à 95 p. 100. NAGY, WEIDLEIN et HIXON (1941) ont montré que l'addition d'acétate de Na jouant comme tampon, améliore l'extraction de la zéine par l'éthanol à 85 p. 100. Ils considèrent néanmoins que la fraction prolamine du maïs serait la fraction protéique la mieux définie et la moins affectée par des variations de température.

En ce qui concerne la fraction albumine on a conseillé pour extraire quantitativement par l'eau, une extraction préalable des lécithines du grain de maïs par l'éther : ERRERA, VOGELS et HAUSS (1931-1932), ERRERA (1932), WALSH (1937).

D'autres facteurs, indépendants de la méthode d'extraction, peuvent également intervenir. Les traitements thermiques, particulièrement à sec, altèrent les matières protéiques. Cette dénaturation des protéines par la chaleur, si elle ne modifie pas de façon sensible la composition chimique globale peut se traduire par des variations de solubilité : celle-ci décroît puis augmente lorsqu'une température plus élevée conduit à des produits de dégradation (MECHAM et OLCOTT (1947)).

On a constaté (VIDAL (1950)) que le traitement des grains de maïs à l'autoclave diminue leur teneur en protéines solubles (albumine globuline) mais affecte principalement les fractions prolamine et glutéline.

On a également constaté que l'entreposage des grains de maïs peut avoir pour conséquences, entre autres, une diminution de la solubilité des protéines. Selon JONES, DEVINE et GERSDORFF (1942) la solubilité des protéines du maïs dans NaCl 3 p. 100 ou l'alcool 70 p. 100 est réduite de 70 p. 100 après deux ans de conservation à 24°C.

3. — **Propriétés de dispersion**

Les méthodes d'extraction, selon les principes d'OSBORNE, étant sujettes à des fluctuations et laissant toujours une fraction azotée insoluble plus ou moins importante, certains chercheurs ont préconisé l'emploi de solvants de nature toute différente permettant de limiter le nombre d'opérations et de se rapprocher le plus possible des conditions permettant l'extraction totale des protéines.

Déjà en 1941, NAGY, WEIDLEIN et HIXON ont pu extraire jusqu'à 85 et dans certains cas 90 p. 100 des protéines du maïs en employant une combinaison solution saline, alcool et alcali. Le salicylate de Na, solvant neutre déjà utilisé pour les protéines du blé s'est révélé un agent de dispersion moins efficace dans le cas du maïs ; ils ont constaté en outre que certains détergents synthétiques (sels de l'acide sulfonique) présentaient une action solubilisante ; dans les deux cas ils n'ont pu extraire plus de 60 à 70 p. 100 des protéines.

En 1944, GORTNER et MACDONALD ont utilisé les méthyl et éthyl cellosolve pour extraire la zéine. OFELT et EVANS (1949) sont parvenus à disperser la protéine sous l'action d'une base forte dans une zone de pH très étroite entre 11,3 et 12,7. Les hydroxydes d'ammonium quaternaires et HCl 12 N ont été également employés comme agents de dispersion.

Plus récemment, FOSTER et coll. (1950) sont parvenus à extraire la totalité des protéines du maïs broyé par des solutions aqueuses diluées d'alkyle benzène sulfonate de Na tamponnées à pH 10 et contenant 0,2 p. 100 de bisulfite. En l'absence de réducteur l'extraction est limitée à 80 p. 100.

Il apparaît donc que l'extraction totale des protéines en une seule opéra-

tion est possible. Mais il ne semble pas qu'on ait voulu tenir compte dans de telles conditions opératoires, de l'action dénaturante des agents de dispersion sur les protéines traitées.

4. — Répartition anatomique et biologique

Divers travaux ont apporté des renseignements sur la répartition anatomique et biologique des protéines.

Spitzer, Carr et Epple (1919), Showalter, et Carr (1922), Bushey (1924) ont montré que le maïs tendre est riche en albumines. Osborne et Mendel (1914 *a*) ont déterminé la répartition des différentes fractions protéiques dans l'endosperme et le germe.

Selon les mêmes auteurs, les globulines sont abondantes dans le maïs à teneur élevée en azote. Elles sont plus abondantes dans le germe (50 à 60 p. 100 des protéines totales) que dans l'endosperme (4,5 à 11 p. 100), ainsi qu'il ressort des travaux de Errera, Vogels et Hauss (1931-1932), Errera (1932), Walsh (1937), Zambotti (1940), Smith, Green et Bartner (1946).

Quant à la zéine, dont de nombreux auteurs ont réalisé l'extraction à partir de grain ou de farine (Mason et Palmer (1934), Zambotti (1940), Swallen (1941), Evans, Foster et Croston (1945)), elle serait en quantités moindres dans le grain tendre que dans le grain mûr (Spitzer, Carr et Epple (1919)). Inégalement répartie dans le grain elle constitue 2,5 à 6 p. 100 des protéines du germe et de 40 à 60 p. 100 des protéines de l'endosperme (Showalter et Carr (1922), Hixon (1938)).

Le maïs enfin, serait pauvre en glutéline et selon Spitzer, Carr et Epple (1919), Showalter et Carr (1922), Bushey (1924) les grains tendres ou durs en contiendraient à peu près la même quantité. Elle est localisée dans l'endosperme.

Certains travaux ont eu pour but l'étude comparée des protéines du maïs et celles des autres céréales (Thompson (1926) et Vickery (1944)).

Des résultats analytiques sur les teneurs des grains de maïs hybrides en diverses protéines et diverses formes d'azote ont été récemment publiés par Klimenko et Nedbaj (1951).

5. — Influence des facteurs génétiques et agronomiques sur la composition en protéines

Les proportions relatives des différentes protéines du maïs peuvent dépendre de l'état physiologique, du type et de la variété du grain.

Zeleny (1935) a trouvé en particulier que la zéine est à peu près inexistante dans le grain immature mais qu'elle est synthétisée rapidement au cours du mûrissement.

Spitzer, Carr et Epple (1919), Showalter et Carr (1922) ont les premiers observé que la variété du maïs avait une influence non seulement sur la teneur en protéines totales du grain, mais encore sur le rapport des protéines constituantes.

Chez les variétés à teneur élevée en azote, la fraction zéine représente un pourcentage plus élevé que chez les variétés pauvres en azote ; c'est ainsi qu'un maïs à 15,7 p. 100 de protides contenait 8,1 p. 100 de zéine alors que pour une autre variété à 8 p. 100 de protides, la zéine représentait 2,2 p. 100 du grain. Les

auteurs constatent en outre que l'accroissement de la teneur en zéine s'accompagne d'une diminution correspondante de la fraction glutéline.

Il semblerait donc, chez les variétés à teneur élevée en azote, que la fraction prolamine est synthétisée aux dépens de l'azote amidé de la fraction glutéline.

Frey (1951 *a*) a récemment confirmé de nouveau cet accroissement parallèle des protéines totales et de la prolamine dans le plant de maïs, après que Hansen, Brimhall et Sprague (1946) eurent établi une relation linéaire entre la teneur en zéine et celle en protides totaux du grain.

Mitchell, Hamilton et Beadles (1952) viennent de préciser la relation entre protéines totales et zéine ; selon leurs observations, la teneur en prolamine augmenterait linéairement avec la teneur en protides jusqu'à un maximum d'environ 14 p. 100 au-delà duquel elle diminuerait.

Sauberlich et coll. (1953 *a*) ont confirmé l'accroissement de la teneur en zéine du grain parallèlement à celui des protides totaux, tout en montrant l'influence exercée par la fertilisation azotée sur la composition du maïs en protéines.

III. — PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES

De même que pour les autres céréales, il est apparu, à mesure que se perfectionnaient les moyens d'investigation, que les fractions protéiques du maïs définies par leurs seules propriétés de solubilité, ne constituaient pas des entités protéiques définies et homogènes. C'est du moins les conclusions qui peuvent actuellement être formulées sur la base des propriétés physico-chimiques établies.

Des diverses fractions protéiques isolées, c'est la zéine qui a fait l'objet du plus grand nombre d'études ; les renseignements sont plus limités en ce qui concerne les fractions globuline et glutéline ; la fraction albumine, dont l'existence a été niée par certains auteurs, n'a fait l'objet d'aucun travail dans ce domaine.

Errera et coll. (1931-1932) ont proposé une méthode d'analyse électrométrique permettant de mettre en évidence et de doser les divers constituants des protéines du maïs ; l'extraction des protéines totales se fait par action de NaOH N/10 ; on procède ensuite à un titrage par HCl avec une électrode d'antimoine.

a) Fraction globuline

Le seul travail concernant cette fraction est dû à Danielsson (1949) qui, à l'ultracentrifugation, a mis en évidence deux globulines distinctes α et γ.

b) Fraction glutéine

Jones et Csonka (1928) ont obtenu deux fractions glutéline α et β par précipitation au $SO_4(NH_4)_2$ d'un extrait alcoolique sodé de maïs. On doit à Csonka, Horn et Jones (1930), Errera, Vogels et Hauss (1931-1932), Errera (1932), Walsh (1937) des indications complémentaires sur les propriétés et l'étude électrométrique de cette fraction glutéline.

c) Fraction prolamine : zéine

En extrayant le maïs à chaud par l'alcool amylique anhydre, Donard et Labbé (1902-1903) ont obtenu un matériel protéique appelé par eux *maïsine*. Une étude de la solubilité dans les alcools éthylique et amylique de cette fraction prolamine, représentant l'équivalent de la zéine actuelle, devait les conduire à définir 3 types de maïsine : la forme α soluble dans les alcools amylique et éthylique, la forme β soluble dans l'alcool éthylique seulement et la forme γ insoluble dans chacun des deux alcools.

D'après une étude de la rotation optique des zéines α et β ainsi définies, Lindet et Ammann (1907) concluent qu'elles représentent deux protéines distinctes.

Watson, Arrhenius et Williams (1936) constatent que la zéine est polydispersée à l'ultracentrifugation. Par additions successives d'eau à une solution de zéine dans l'éthanol 70 p. 100, ils obtiennent trois fractions distinctes et presque homogènes. Leurs résultats indiquent qu'une fraction représentant 60 p. 100 de la zéine aurait un poids moléculaire d'environ 35 000 ; par le calcul ils admettent que la protéine non fractionnée aurait un poids moléculaire moyen d'environ 40 000, valeur confirmée ultérieurement par les travaux de Saverborn, Danielsson et Svedberg (1944).

Par extractions successives au méthanol et l'éthanol aqueux 70 p. 100 Elliott et Williams (1939) opèrent un fractionnement du « gluten » de maïs, bien que les protéines du maïs ne présentent pas la propriété de former une substance glutineuse à la manière des protéines du blé.

A partir de dispersions de zéine dans le méthyl et éthyl cellosolve et par additions successives d'eau, Gortner et MacDonald (1944) à leur tour, fractionnent la zéine en deux types de protéines différant par leur teneur en azote et certaines propriétés physico-chimiques : l'une hydrophobe, précipitée en masse compacte, l'autre hydrophile formant une suspension stable. Des études concernant le pouvoir rotatoire et la pression osmotique des fractions obtenues indiquent la présence d'au moins trois composants. Selon ces auteurs, la zéine contiendrait donc trois groupes de constituants de poids moléculaires différents .

1. Poids moléculaire 45 000 65 % de la protéine totale ..... type I
2. Poids moléculaire 30 000 25 % de la protéine totale ..... type I
3. Poids moléculaire 23 350 10 % de la protéine totale ..... type II

L'emploi de plus en plus fréquent des détergents synthétiques comme agents de dispersion des protéines devait conduire Foster (1949) à montrer, dans le cas particulier de la zéine que, dans de telles solutions, la protéine se trouve à l'état de complexe stable zéine-détergent. Ofelt et Evans (1949) ont donné des graphiques traduisant les variations de la viscosité de dispersions de zéine dans divers solvants en fonction du pH.

Les résultats qui se dégagent d'autres études relatives au comportement électrophorétique de la fraction zéine viennent à l'appui des précédentes observations et tendent à confirmer que cette fraction ne peut être considérée comme une protéine homogène.

Selon Scallet (1947) la zéine contient au moins 6 constituants séparables par électrophorèse. Les résultats plus récents encore de Foster, Tsi-Yang et Yui (1950) obtenus par analyse électrophorétique d'une dispersion des protéines du maïs dans une solution aqueuse d'alkyl benzène sulfonate de Na, montrent la présence d'au moins 8 composants protéiques dont 3 seraient apparentés à la zéine.

IV. — LES ACIDES AMINÉS DU MAIS

1. — Acides aminés du grain et de ses constituants

La composition du grain de maïs en acides aminés a fait l'objet de très nombreux travaux. Citons à ce sujet ceux déjà anciens rapportés par NOLLAU (1915), BREWSTER et ALSBERG (1919), HAMILTON, NEVENS et GRINDLEY (1921), MORRIS (1934), CSONKA (1939).

Parmi les plus récents, on en relève de très nombreux relatifs à la détermination quantitative de certains acides aminés individuels et plus particulièrement en ce qui concerne tryptophane, lysine et méthionine : GREENE et BLACK (1944), RIESEN et coll. (1946), GERRY et coll. (1948), LYMAN et KUICKEN (1949), RUDRA et CHOWDHURY (1950), MITCHELL et coll. (1952), AGUIRRE et coll. (1953).

Nous avons rassemblé sous forme de tableau les résultats récents les plus complets obtenus dans ce domaine. Les valeurs publiées par BLOCK et BOLLING (1945) puis BLOCK et MITCHELL (1946-1947) expriment les teneurs moyennes établies antérieurement par un très grand nombre de méthodes, pour la plupart chimiques. Celles qui ont été publiées postérieurement par les auteurs figurant sur le tableau sont l'aboutissement de travaux effectués à l'aide des méthodes microbiologiques. Un certain nombre ont été empruntées à l'importante étude bibliographique de CANNON et coll. (1952). Nous avons rapporté en outre les résultats de SAUBERLICH et coll. (1953) indiquant les variations de composition observées en fonction de la variété et de la fertilisation azotée, et ceux de FLYNN et coll. (1954) relatifs à 28 échantillons de maïs à teneur variable en protides.

Le grain de maïs contient tous les acides aminés essentiels.

Comparé au blé, il apparaît sensiblement plus riche en acides aminés aromatiques, tyrosine et phénylalanine ; il est par contre plus pauvre en tryptophane, bien que GERRY et coll. (1948) aient signalé des teneurs comprises entre 0,22 et 0,34 p. 100 du grain sec. Le grain de maïs est également légèrement plus riche que le grain de blé en valine et méthionine, et présente une teneur en leucine et isoleucine sensiblement doublée.

Si, comme l'ont fait MITCHELL et BLOCK (1946), on compare la composition quantitative des protéines du maïs à celles de l'œuf, on met en évidence leur déficience en lysine.

Le germe de maïs présente des teneurs sensiblement équivalentes à celles du grain entier mais se révèle plus riche en arginine, lysine et tryptophane. Comparées aux protéines de l'œuf, les protéines du germe se révèlent déficientes en méthionine.

Bien qu'on ne possède aucun résultat récent sur la composition du son en acides aminés, il apparaît que ses protéines contiennent une quantité élevée de tyrosine.

2. — Acides aminés libres

Ils sont présents en petite quantité. JODIDI (1925) a le premier signalé la présence de polypeptides et d'acides aminés libres dans le maïs non germé. ZELENY et COLEMAN (1939) étudiant l'acidité du maïs, ont trouvé qu'il fallait 11,7 mg de KOH pour neutraliser les acides aminés libres de 10 g de grain (en substance sèche). Les méthodes modernes de chromatographie viennent récem-

ment d'être appliquées par Beauchesne et Nétien (1952) à l'étude des acides aminés d'un « extrait » de grains de maïs immatures. La séparation est réalisée à l'aide d'une résine synthétique et l'identification par chromatographie de partage sur papier. Ils ont trouvé à une concentration assez élevée α alanine, acide γ amino-butyrique, acide aspartique, acide glutamique ; en quantités moindres : sérine, glycocolle, thréonine, tyrosine, β alanine, valine, proline et lysine ; en quantités plus faibles : asparagine, histidine, arginine, phénylalanine, leucines.

Un travail similaire de Duvick (1952) s'est adressé à l'albumen des grains de maïs en voie de croissance. La chromatographie a permis d'identifier la plupart des acides aminés précités à l'exception de la thréonine, phénylalanine, des acides diaminés et de l'acide γ amino-butyrique ; on assiste à une diminution de leur concentration après la pollinisation. En outre le rapport (acide glutamique + acide aspartique + sérine)/alanine est constant dès la semi-maturité du grain jusqu'à sa maturité totale.

Le métabolisme du tryptophane a été plus particulièrement étudié par Teas, Cameron et Newton (1952) à divers stades du développement de deux types de grains (sucrés et féculents).

3. — **Acides aminés constituants des protéines**

a) Protéines solubles

On possède peu de renseignements sur la composition en acides aminés de cette fraction azotée du grain.

Des valeurs ont été données concernant la teneur en tryptophane des fractions albumine et globuline ; elles seraient respectivement, selon Tillmans et Alt (1925) de 1,30 p. 100 dans l'albumine et 1 p. 100 dans la globuline. Un travail ultérieur de Tillmans, Hirsh et Stoppel (1928) a donné les valeurs rectifiées concernant tryptophane et tyrosine.

	Albumine	Globuline
Tryptophane p. 100.....	1,40	1,06
Tyrosine p. 100	2,04	1,13

La fraction « albumines » (« steep-water proteins ») dont la composition a été donnée par Block et Bolling (1945) représente le matériel azoté qui est extrait par l'eau lors du traitement industriel du grain destiné à l'amidonnerie. On sait qu'une telle fraction entre dans la composition des milieux de culture de l'industrie des antibiotiques. Ces « albumines » du maïs sont pauvres en tryptophane mais constituent, par contre, une source riche en histidine.

Windsor (1951) a récemment identifié l'acide α amino-adipique dans la fraction azotée du grain de maïs soluble dans l'eau et a étudié son comportement en chromatographie sur amidon.

b) Protéines insolubles

Les protéines insolubles du grain (prolamine + glutéline) considérées dans leur ensemble ont été relativement peu étudiées. On relève un travail de May et Rose (1922) sur la teneur en tryptophane du « gluten » de maïs trouvée égale à 1,08 p. 100, tandis que Matsuyama et Mori (1923) rapportent que les protéines insolubles contiennent seulement des traces de cet acide aminé.

Composition en acides aminés du grain du germe et du son de maïs.

	Grain entier										*Germe*							*Son*
	En p. 100 des Protides (Calculé sur la base de 16 % en N total)									Écart p. 100 p. rapt. Prot. œuf	En p. 100 de substance sèche			En p. 100 des Protides (Calculé sur base de 16 % N total)			Écart p. 100 p. rapt. Prot. œuf	En % de substance sèche	% des Prot.
		Maïs blanc	Maïs jaune									Maïs jaune			Maïs blanc	Maïs jaune		Déli-pidé		Délipidé	
Alanine	—	—	—	—	—	—	—	—	9,3-10,6	—	—	—	0,71-1,21	—	—	—	—	—	—	—	—
Arginine	4	1,9-3,1	2 -4,8	4,8	2,1-4,2	4,3	4,7	4,7	5,3-6,1	— 25	0,4	—	0,46-0,61	6,8	5,5	8,1	8,1	8,9	+ 27	—	—
Acide aspartique	—	—	—	—	—	—	—	—	12,1-12,5	—	—	—	0,98-1,37	—	—	—	—	—	—	—	—
Cystine	1,1	0,9-1,5	0,8-1,2	1,5	0,8-1,4	—	—	1,04-1,76 (16)	1,9	— 37	—	0,107-0,227 (16)	0,14-0,22	1,2	0,6-1,1	1,8	1,8	—	— 25	—	—
Acide glutamique	—	—	—	—	—	—	—	—	15,1-15,6	—	2,1	—	1,15-1,77	—	—	—	—	—	—	—	—
Glycine	—	—	—	—	—	—	—	—	2,9-3,2	—	—	—	0,24-0,33	—	—	—	—	—	—	—	—
Histidine	2,4	0,8-2,2	1 -2,5	2,2	1,9-2,6	2,4	2,2	2,2	2,2	— 5	0,3	0,31	0,16-0,25	2,7	2,4	2,9	2,9	2,7	+ 38	0,67	3,4
Isoleucine	3,6	3,6	—	4	—	4,2	6,4	5,6 (14)	3,6-3,9	— 50	0,6	0,60	0,27-0,44	3,7	3,7	—	4	—	— 50	0,90	3,7
Leucine	21,5	21,5	—	22	—	10,5	15	14,7 14 (14)	9,3-12,6	+ 139	1,4	2	0,71-1,43	16,3	16,3	—	13	7,4	+ 41	1,83 1,65 (7)	10,3
Lysine	2,5	1 -2,1	1-2,9	2	2,8 (12)-3,2	2,3	2,3	2,3 2,24-3,65 (16)	2,4-3	— 72	0,3	0,32 0,272-0,410 (16)	0,23-0,27	5,8	4,2	5,8	5,8	5,9	— 19	1,45	—
Méthionine	—	—	—	3,1	1,2 (12)-1,6	—	1,4	1,45-2,75 (16)	1,9-2,1	— 24	0,2 0,08 (13)	0,21 0,156-0,312 (16)	0,17-0,22	2,3	3	1,6	1,6	—	— *61*	0,36	—
Phénylalanine	4,5	5	4	5	—	4,3	4,8	5,3	4,1-4,8	— 21	0,5	—	0,31-0,55	5,6	5,6	5,5	5,5	3,9	— 13	—	—
Proline	—	—	—	—	—	—	—	—	7,1-9,6	—	—	—	0,54-1,10	—	—	—	—	—	—	—	—
Sérine	—	—	—	—	—	—	—	—	4-4,5	—	0,8	—	0,30-0,51	—	—	—	—	—	—	—	—
Thréonine	3,6	3,7	3,4	3,7	—	3,1	3,9	3,9	4,7-4,9	— 24	0,3	0,54 0,67 (5)	0,38-0,53	4,4	4,7	4	4,7	4,4	— 4	1,09	4
Tryptophane	0,6	0,4-0,6	0,5-1,1	0,8	0,5-0,7 0,8-1 (12)	—	0,5	0,93 (14) 0,61-1,08 (16)	0,99-1,19	— 47	0,05	0,079-0,111 (16)	0,09-0,113	1,3	1,3	1,3	1,3	—	— 13	—	1
Tyrosine	6,1	5,6-7,1	5,5-6,3	5,5	5,6-7,3	—	—	—	3,7-4,1	+ 22	0,2	—	0,28-0,47	4,9	3,8-4,3	6,7	6,7	—	+ 49	—	10,8
Valine	4,6	4,6	—	5	—	5,1	5,3	5,3 4,9 (14)	7,1-7,5	— 32	0,5	—	0,57-0,81	5,8	5,8	—	6	5,7	— 18	1,39	4,8
Auteurs	1	1	1	2	4	8	9	11	15	6	3	10	15	1	1	1	2	10 selon (11)	6	10	1

1. Block et Bolling (1945). — 2. Block et Mitchell (1946-47). — 3. Baumgarten et coll. (1946). — Krueger (1947). — 8. Schweigert (1947-48). — 9. Jones et coll. (1948). — 10. Horn, Jones et Blum (1946-49). 14. Frey (1951*a*). — 15. Sauberlich et coll. (1953). — 16. Flynn et coll. (1954).

4. Doty et coll. (1946). — 5. Greenhut et coll. (1946 *a*). — 6. Mitchell et Block (1946). — 7. Hodson et — 11. Kuhnau (1950). — 12. Miller, Aurand et Flach (1950). — 13. Rudra et Chowdhury (1950). —

Les résultats publiés par BLOCK et BOLLING (1945) puis BLOCK et MITCHELL (1946-1947) expriment les valeurs moyennes qui ont été obtenues par un grand nombre de méthodes analytiques. Ils ne font pas apparaître de différences bien marquées entre les préparations obtenues à partir de maïs jaune ou de maïs blanc si ce n'est une teneur plus élevée en lysine dans le dernier cas.

Les teneurs fournies par BAUMGARTEN et coll. (1946) sur deux préparations industrielles « gluten meal » et « gluten feed » ont été déterminées par analyses microbiologiques. Elles mettent en évidence la pauvreté des protéines du « gluten » de maïs en tryptophane, lysine et méthionine à côté de leur richesse en leucine et acide glutamique. Signalons au passage une préparation de l'acide glutamique à partir des protéines du maïs indiquée par MEYER (1949).

Zéine

La plus importante en quantité, la plus étudiée des protéines du maïs, la zéine a donné lieu à un très grand nombre de travaux concernant sa composition en acides aminés.

Les premiers résultats importants publiés sont dus à KOSSEL et KUTSCHER (1900-1901) puis à LANGSTEIN (1902-1903), OSBORNE et coll., OSBORNE et CLAPP (1908), OSBORNE et LIDDLE (1910), OSBORNE et JONES (1910).

Des résultats plus ou moins fragmentaires furent ultérieurement présentés dont nous citerons pour mémoire les noms des auteurs : FOLIN et LOONEY (1922), DAKIN (1923-1924), JONES GERSDORFF et MOELLER (1924), TERNUCHI et OKABE (1928-1929), TILLMANS, HIRSCH et STOPPEL (1928), FOLIN et MARENZI (1929 *a* et *b*), FURTH, SCHOLL et HERMANN (1932), FURTH et MINNIBECK (1932), KAPELLER-ADLER (1932), BAERNSTEIN (1936), VICKERY (1938), LAINE (1939), VIRTANEM LAINE et TOIVONEM (1940), GIRAL et GRAVIOTO (1941), BORCHERS et coll. (1942), CHIBNALL (1943), MICHEL, BOZZI et TICHADOU (1947).

LAINE (1945) puis VIRTANEM et HAMBERG (1947) se sont plus particulièrement préoccupés de la périodicité des acides aminés constituant la molécule de zéine.

Telle qu'elle a été donnée par BLOCK et BOLLING (1945), la composition de la zéine en acides aminés résume l'ensemble des résultats obtenus antérieurement par des techniques extrêmement diverses. Des études récapitulatives, tenant compte de la mise en œuvre des méthodes modernes d'analyse, ont été présentées ultérieurement par TRISTRAM (1949), BLOCK et BOLLING (1951) et CANNON et coll. (1952). L'ensemble de ces résultats a été groupé dans le tableau ci-contre, parallèlement aux valeurs les plus récentes obtenues par THOMPSON et STEWART (1952) à l'aide de la chromatographie sur papier. En accord avec les observations de ZITTLE et ELDRED (1944) et NEUBERGER (1945), (ayant utilisé la lysine-décarboxylase) ces auteurs concluent à l'absence totale de lysine dans la protéine ; ils signalent par contre pour la première fois la présence de glycine. Également par analyse chromatographique, GEIGER et coll. (1952) observent que les produits de digestion enzymatique de la zéine sont dépourvus de proline et de thréonine alors que l'hydrolyse acide les fait apparaître.

Les travaux les plus récents semblent donc bien confirmer certaines observations déjà anciennes concernant les caractéristiques de composition de la zéine : traces à peu près négligeables sinon absence totale de glycine, de lysine et de tryptophane. La protéine est par contre riche en acide glutamique, leucine et proline, et relativement riche en phénylalanine et tyrosine. Comme la gliadine du blé, elle est déficiente en arginine et histidine.

Gluténine

On ne possède pas de données récentes sur la composition de cette protéine du maïs. Les auteurs semblent d'accord pour lui reconnaître une teneur en tryptophane nettement supérieure à celle de la zéine : 1,08 p. 100 de la protéine selon TILLMANS et ALT (1925), 1,16 p. 100 selon TILLMANS, HIRSCH et STOPPEL (1928), la tyrosine représentant 5,3 p. 100. Les valeurs obtenues ultérieurement et qui figurent dans le tableau montrent que la gluténine du maïs contient également davantage de lysine, arginine et histidine que la zéine.

Parallèlement à la gluténine, figure la composition de la fraction dénommée « zéine résidue » par BLOCK et BOLLING (1945). Elle correspond sensiblement au matériel protéique insoluble du maïs après extraction de la fraction prolamine, matériel dans lequel se trouve inclus la glutéline. Le « gluten » dont on a extrait la zéine constitue un matériel riche en tyrosine et phénylalanine mais de teneur moyenne en tryptophane ; moins riche en leucine que la zéine, ses teneurs en arginine et méthionine sont plus élevées.

En résumé, à l'exception des protéines du germe, les protéines du maïs sont déficientes en lysine et en tryptophane. Le « gluten » de maïs et les protéines solubles (« steep-water proteins ») ont une teneur en tryptophane particulièrement faible.

4. — **Variations dans la composition en acides aminés**

Les résultats analytiques de 28 variétés de maïs obtenus par DOTY, BERGDOLL, NASH et BRUNSON (1946) montrent que les teneurs du grain de maïs en certains acides aminés (arginine, histidine, cystine, tyrosine et tryptophane) sont reliées à la constitution génétique de la plante. Ces auteurs ont constaté en outre que la variété présentant les teneurs les plus élevées en ces acides aminés, avait une teneur élevée en glutéline et la teneur la plus faible en zéine.

La teneur en protides totaux, elle-même conditionnée par des facteurs de nature génétique ou agronomique, exerce son influence sur la composition du maïs en certains acides aminés.

Un travail de FREY (1951 *a*) portant sur des plants de maïs a eu pour objet le dosage microbiologique de valine, leucine, isoleucine et tryptophane parallèlement à celui des protides totaux et de la fraction zéine. L'auteur a pu constater que pour un accroissement de la teneur en protides totaux, la teneur en leucine augmentait alors que celle en tryptophane et valine diminuait.

Confirmant en partie ces observations, MITCHELL, HAMILTON et BEADLES (1952) ont montré que les teneurs en lysine et tryptophane diminuent à mesure qu'augmente celle en protides totaux.

AGUIRRE et coll. (1953 *a* et *b*) ont donné les teneurs moyennes en lysine (0,32 p. 100), méthionine (0,14 p. 100) et tryptophane (0,046 p. 100), intéressant 23 variétés de maïs. Les résultats obtenus font ressortir l'influence considérable de la variété et plus encore celle du milieu sur la composition du grain en acides aminés. C'est également ce que montrent les valeurs publiées par FLYNN et coll. (1954) portant sur 29 variétés différentes. Enfin, selon SAUBERLICH et coll. (1953) le mode de fertilisation azotée accroît encore les variations de composition du grain en fonction de la variété.

Composition en acides aminés des protéines et du « gluten » du maïs

(En p. 100 des protéines) (Calculé pour une teneur de 16 p. 100 en N)

	Albumines	Zéine							Glutéline			« Gluten »						
												P. 100 des Protides (N = 16 %)					P. 100 de substance sèche	
	« Steep-water proteins »							« Zéine résidue »					Maïs blanc	Maïs jaune			Feed	Meal
Alanine	—	9,9	9,75	—	—	10,5	11,4	10,3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Arginine	5,4-7,1	1,6	3,3 (12)	1,6	1,9	1,7	1,8	1,8	2,9	6,7	9,4 (3) ; 7,6	3,1	3	3,1	3,1	3,4	0,7	1,2
Acide aspartique	—	3,4	—	—	—	4,6	5,6	5,4	—	0,6	—	—	—	—	—	—	—	—
Cystine-Cystéine	0,5	0,8	—	1	—	0,8	1	0,6	1,8	—	1 (3) ; 2,8 ; 0,5 (5)	1,2	0,7-1,5	1,5	1,1	—	—	—
Acide glutamique	—	35,6	—	—	—	26,9	26,6	31,8	—	12,7	—	24,5	—	—	—	—	4,5	9,4
Glycine	—	0	—	0	—	—	0	1,4	9,6	0,25	0,8 (6)	4,3	—	—	4,3	—	—	—
Histidine	3-6,7	0,9	0,85 (9) ; 2,2 (12)	1	0,76	1,3	1,7	—	1,6	2,8	3,9 (3) ; 1,7	1,7	1,6	1,6	1,6	2,1	0,8	1
Isoleucine	1,3	4,3	—	5	5,05	22,5	7,3	26,9	2	—	—	4,9	—	4,9	5	—	1,3	2,4
Leucine	11,3	23,7	15,4 (11) ; 27,2 (8)	25	21,2		23,7		11	6,2	—	24,7	—	24,7	24	17,1	3	7,3
Lysine	1	0	0,06 (11)	0	0,2	0	0	0	1,6	2,8	4,5 (3) ; 6,7	1,1	1,5	0,8	0,8	1,2	0,8	0,8
Méthionine	—	2,4	1,7 (7)	2	1,5	2,4	2,3	1,5	4,8	—	—	5,5	4	5-5,5	2,5	—	0,4	0,9
Phénylalanine	1,7	6,4	4	6,6	7,3	5,9	6,4	13,6	4,5	1,7	—	6,6	6,8	6,4	6,4	5,7	1	2,5
Proline	—	9-12	—	—	—	10,5	10,4	10,6	—	5	—	—	—	—	—	—	—	—
Sérine	—	—	—	—	—	7	7,7	5,9	—	—	—	—	—	—	—	—	0,9	1,7
Thréonine	3,9	2,4	—	2,5	2,6	3,4	3	3,3	4	—	—	4	4,1	3,9	4,1	3,7	1	1,4
Tryptophane	0,7	0,1	—	0,2	—	1	0,1	—	1,1	—	2,1 (5) ; 2,1	0,6	0,5-0,7	0,7	0,7	—	0,1	0,2
Tyrosine	3,8	5	—	5,9	—	5,3	5,2	6,6	6,2	3,5	5 (5) ; 5	6,2	5,9-6,1	6,7	6,7	—	0,4	1,1
Valine	2,5	2,4	2,2 (8)	3	4	3,5	3	4	5,5	—	—	4,6	—	4,6	5	5,2	1,5	2,1
Auteurs	13	13	7 à 12	14	15	17	18	19	13	1-2	4	13	13	13	14	(+) 15	16	16

1. Osborne et Clapp (1908). — 2. Osborne, Leavenworth et Brautlecht (1909). — 3. Larmour (1927). — 1945). — 12. Macpherson (1946). — 13. Block et Bolling (1945). — 14. Block et Mitchell (1946-47). — 15. Jones et Csonka (1928). — 5. Csonka (1932). — 6. Patton (1935). — 7. Lavine (1943). — 8. Roche et Mour Horn, Jones et Blum (1946 à 49). — 16. Baumgarten et Coll. (1946). — (+) Cités par Kuhnau (1950). — 17. (1943). — 9. Vickery et Winternitz (1944). — 10. Zittle et Eldred (1944). — 11. Brand, Ryan et Diska Tristram (1949). — 18. Block et Bolling (1951). — 19. Thompson et Stewart (1952).

V. — VALEUR NUTRITIVE DES PROTIDES DU MAIS

1. — Grain

Osborne et Mendel (1914 et 1914 *a*) ont, les premiers montré la valeur nutritionnelle limitée des protéines du maïs, déficientes en tryptophane et lysine. Plus tard, Mitchell (1924) a trouvé que la valeur biologique des protéines du maïs entier incorporé au régime à raison de 5 et 10 p. 100 était respectivement de 72 et 60. Marais et Smuts (1940) devaient mettre ensuite en évidence la déficience en lysine des protéines du maïs. La supplémentation du maïs par la lysine ne détermine cependant qu'une augmentation légère de la croissance en raison de la déficience secondaire des protéines en tryptophane. Les observations les plus récentes dans ce domaine semblent montrer que la valeur nutritionnelle des protéines du maïs décroît à mesure que s'accroît la teneur en protides totaux. Telles sont les conclusions auxquelles est parvenu Frey (1951 *a*), confirmées par le travail de Mitchell, Hamilton et Beadles (1952). Parallèlement à l'accroissement de la teneur en protides, ces auteurs constatent une légère augmentation de la digestibilité mais, par contre, une importante diminution de la valeur biologique dont la cause essentielle est l'abaissement des teneurs en lysine et tryptophane. Ils suggèrent qu'en supplémentant les protéines du maïs en ces 2 acides aminés, il serait possible de leur conférer une valeur biologique sensiblement identique à celle des protéines animales. Sauberlich et coll. (1953 *b*) ont fait par ailleurs une étude comparée de la valeur nutritive des maïs à haute et faible teneur en protides dans la croissance du rat et du poulet et Ross et coll. (1954) dans celle de l'agneau.

Quoiqu'il en soit, la plupart des physiologistes s'accordent pour reconnaître l'infériorité manifeste des protéines du maïs entier du point de vue nutritionnel. Beaucoup plus déficient que le blé en acides aminés indispensables, son taux de lysine et de tryptophane notablement plus bas fait qu'une adjonction moyenne de maïs au blé suffit pour obtenir un mélange incapable de satisfaire au besoin azoté. A l'opposé, la teneur extraordinairement élevée de cette céréale en leucine, ne semble comporter aucun bénéfice in vivo. Blaizot et Jacquot (1948) ont montré que le pain à base de maïs est notablement inférieur au pain de farine de blé : il suffit d'introduire en panification 30 p. 100 de farine de maïs pour obtenir un pain totalement inapte à assurer la croissance.

Sure (1953 *a*) a néanmoins constaté une amélioration très marquée de l'efficacité des protides du maïs jaune en grain par addition à la ration de 0,5 p. 100 de thréonine en présence de lysine et de tryptophane.

2. — Germe

Comparée au grain entier, il apparaît cependant que la valeur nutritive des protéines du germe est supérieure. Mitchell et Beadles (1944) considèrent que la valeur biologique des protéines du germe de maïs délipidé s'apparente à celle des protéines animales. Jones et Widness (1946) ont montré néanmoins que les protéines du germe de blé sont supérieures à celles du germe de maïs, et Belson, Lehrer et Woods (1947) constatent également que l'efficacité des protéines du germe est moindre pour le maïs que pour le blé.

Les mêmes conclusions se dégagent des expériences faisant intervenir le germe de maïs dans la supplémentation de la farine de blé. Hove et Harrel

(1943 *b*) trouvent que la valeur protéique du germe de maïs supplémentant la farine blanche est de 1,71, contre 2,26 pour un mélange supplétif lait écrémé, germe de blé délipidé. STARE et HEGSTED (1944) confirment cette infériorité du germe de maïs sur le germe de blé dans la supplémentation.

3. — **Facteurs modifiant la valeur nutritive**

La valeur nutritive des protéines du germe serait conditionnée dans une certaine mesure par le traitement subi lors de leur extraction. Selon BLOCK et BOLLING (1943) la valeur protéique du germe de maïs délipidé par les solvants est de 1,8 alors que le même germe extrait par la méthode « d'expulsion à chaud » a une valeur protéique de 2,1. SCHULZ et THOMAS (1949) constatent au contraire que les protéines du germe extraites par dissolution sont biologiquement moins bien utilisées que lorsque le germe a été délipidé par les solvants.

La valeur protidique du maïs, de même que celle des autres céréales peut être altérée par certains traitements thermiques trop poussés pratiqués dans certaines préparations alimentaires. C'est ce qui a été montré par MORGAN et coll. (1926-1931) et par ACHARYA et coll. (1942). La simple cuisson à l'eau bouillante ne semble pas préjudiciable à la valeur protidique.

Quelques auteurs ont tenté de préciser l'influence du stockage sur la valeur biologique. JONES, DIVINE et GERSDORFF (1942) et MITCHELL (1944) ont rapporté que le stockage du maïs à l'état de grains ou de farines pendant plusieurs mois ou davantage, détermine une diminution de la valeur biologique des protéines. Plus récemment, MITCHELL et BEADLES (1949) notent une bonne conservation de la valeur biologique des protéines du maïs après stockage à 25°C et pendant 2 à 3 ans, sous forme de grains ou de produits de mouture présentant une humidité de 6 à 12 p. 100.

SCHULZ et THOMAS (1949) ont signalé que le germe de maïs ayant été stocké à température ordinaire pendant quelques mois, 2 ans et 6 ans, a une valeur biologique respective de 83, 79 et 53, mettant ainsi en évidence l'action néfaste de la conservation dans le cas particulier du germe.

Mettons un terme à ce chapitre en signalant le travail de BENTLEY, BOOTH, GREER, HEATHCOTE, HUTCHINSON et MORAN (1948) montrant le rôle néfaste éventuel de certains améliorants des farines sur les protéines des céréales. Le traitement par le trichlorure d'azote de certaines protéines végétales (contenant au moins 2 p. 100 de méthionine) et de la zéine en particulier, détermine la formation d'un dérivé oxydé toxique provoquant chez le chien l'hystérie à un degré élevé. Une fois la méthionine détruite par oxydation, la zéine peut encore fixer une quantité importante de trichlorure sans formation supplémentaire de complexe toxique.

BIBLIOGRAPHIE

ABDERHALDEN. — *Z. Physiol. Chem.*, 1907, **52**, p. 515.
ABDERHALDEN. — *Biochem. Handle*, 1914, **9**.
ABDERHALDEN, ERWALD, FODOR et ROSE. — *Arch. Ges. Physiol.*, 1915, **160**, p. 511.
ABDERHALDEN et GIGON. — *Z. Physiol. Chem.*, 1907, **53**.
ABDERHALDEN et SAMUELY. — *Z. Physiol. Chem.*, 1905, **44**, p. 276.

ACHARYA, NIYOGI et PATWARDHAN. — *Ind. J. Med. Res.*, 1942, **30**, p. 73.
AGREN. — *Acta Chem. Scand.*, 1949, **3**, p. 931.
AGUIRRE, BRESSANI et SCRIMSHAW. — *Food Res.*, 1953 *a*, **18**, p. 273.
AGUIRRE, ROBLES et SCRIMSHAW. — *Food Res.*, 1953 *b*, **18**, p. 268.
ALEXINSKY et COIC. — *C. R. Acad. Agric. Fr.*, 1954, **40**, p. 656.
ALLISON, WHITE, AJERMAN et ROTH. — *Cereal Chem.*, 1950, **27**, p. 495.
ALLOUF, MUNIER et MACHEBŒUF. — *Proc. Eur. Brew. Conv.*, Nice, 1953, p. 39.
ANDREWS. — *Baker's Digest*, 1953, **27**, p. 80.
ARHENIUS. — *J. Chem. Phys.*, 1937, **5**, p. 63.
ARPIN. — *Ann. Chim. Anal. Appl.*, 1902, **7**, p. 325.
AUERMAN, KRETOVICH, ALYAKRINSKAYA, BAZARNOVA et TOKAREVA. — *Doklady Akad. Nauk. S. S. S. R.*, 1953, **92**, p. 131.
AVILA et MIKENBERG. — *Rev. Invest. Agric.*, 1951, **5**, p. 393.
BAERNSTEIN. — *J. Biol. Chem.*, 1932, **97**, p. 669 ; 1936, **115**, p. 25.
BAILEY. — The Chemistry of wheat flour. *The chemical catalog. Co*, N. Y., 1925, chap. IV, p. 56.
BAILEY. — The constituants of wheat flour and wheat products. *Reinhold Publ. Co*, N. Y., 1944.
BAILEY et BLISH. — *J. Biol. Chem.*, 1915, **23**, p. 345.
BAILEY, CAPEN et LECLERC. — *Cereal Chem.*, 1935, **12**, p. 441.
BAINS. — *Cereal Chem.*, 1953, **30**, p. 139.
BAKER, PARKER et MIZE. — *Cereal Chem.*, 1942, **19**, p. 334.
BAKER, PARKER et MIZE. — *Cereal Chem.*, 1944, **21**, p. 97.
BALASUBRAMANIAN, RAMACHANDRAN, VISWANATHA et DE. — *Ind. J. Med. Res.*, 1952, **40**, p. 73 et p. 219.
BALLS et HALE. — *Cereal Chem.*, 1936, **13**, p. 54.
BALLS et HALE. — *Cereal Chem.*, 1940, **17**, p. 243.
BALLS, HALE et HARRIS. — *Cereal Chem.*, 1942 *a*, **19**, p. 279.
BALLS, HALE et HARRIS. — *Cereal Chem.*, 1942 *b*, **19**, p. 840.
BANG. — *J. Inst. Brewing*, 1930, **36**, p. 381.
BARMORE. — *Cereal Chem.*, 1947, **24**, p. 49.
BARMORE. — *Baker's Digest.*, 1948, **22**, p. 10.
BARTON-WRIGHT et MORAN. — *Analyst.*, 1946, **71**, p. 278.
BASU et BASAK. — *Ind. J. Med. Res.*, 1937, **24**, p. 1043.
BAUMGARTEN, MATHER et STONE. — *Cereal Chem.*, 1946, **23**, p. 135.
BEAUCHESNE et NETIEN. — *C. R. Soc. Biol.*, 1952, **146**, p. 1342.
BEAUDOIN, MAYER et STARE. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1951, **78**, p. 450.
BELSON, LEHRER et WOODS. — *J. Nutrit.* 1947, **34**, p. 587.
BENNET, STANFORD et DUMESNIL. — *Proc. Soil. Sci. Soc. Amer.*, 1953, **17**, p. 252.
BENTLEY, BOOTH, GREEN, HEATHCOTE, HUTCHINSON et MORAN. — *Nature*, 1948, **161**, p. 126.
BERLINER et KOOPMAN. — *Z. Ges. Mühlen.*, 1929, **6**, p. 33.
BERRY. — *J. Agr. Sc.*, 1920, **10**, p. 359.
BIECHY et SPINDLER. — *Mühlenzeit.*, 1950, **4**, p. 68.
BISERTE et SCRIBAN. — *Petit J. Brasseur*, 1949, p. 246. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1950 *a*, **32**, p. 959. — 8e *Congr. Intern. Ind. Agr.*, Bruxelles, 1950 *b*, **1**, p. 534. — 2e *Congr. Intern. Ind. Ferment.*, Gand, 1952. — *Proc. Europ. Brew. Conv.*, Nice, 1953, p. 48. — *Ann. Nutrit. Alim.*, 1954, **8**, p. 699.
BISHOP. — *J. Inst. Brewing*, 1928, **34**, p. 101 ; 1929, **35**, p. 323 ; 1930, **36**, p. 336. *J. Inc. Brewer's Guild Tid.*, 1944, **56**, p. 75 ; 1949, **35**, p. 440.
BLAIZOT et JACQUOT. — *Jour. Sc. du Pain*, Paris, 1948, p. 435.
BLISH. — *J. Ind. Eng. Chem.*, 1916, **8**, p. 138. — *Cereal Chem.*, 1925, **2**, p. 127. — *Cereal Chem.*, 1936, **13**, suppl. 16. — *Bull. Ec. Meun. Belge*, 1937, **6**, p. 97. — *Adv. in Prot. Chem.*, 1945, **11**.
BLISH et PINKNEY. — *Cereal Chem.*, 1924, **1**, p. 309.

BLISH et SANDSTEDT. — *Cereal Chem.*, 1925, **2**, p. 55 ; 1926, **3**, p. 144. — *J. Biol. Chem.*, 1929 *a*, **85**, p. 195. — *Cereal. Chem.*, 1929 *b*, **6**, p. 494 ; 1933, **10**, p. 359.
BLOCK et BOLLING. — *J. Amer. Diet. Ass.*, 1944, **20**, p. 69.
BLOCK et BOLLING. — *Arch. Biochem.*, 1943, **3**, p. 217. — The amino-acids composition of proteins and foods, 1945, *Thomas-Springfield Edit. U.S.A* ; 1951, 2e édit.
BLOCK et MITCHELL. — *Nutr. Abst. and Rev.*, 1946-47, **16**, p. 249.
BOAS, FIXSEN et JACKSON. — *Biochem. J.*, 1932, **26**, p. 1923.
BONNER. — *Plant Biochem. Acad. Press. N. Y.*, 1950.
BORCHERS, TOTTER et BERG. — *J. Biol. Chem.*, 1942, **142**, p. 697.
BOURDET. — *Meun. Franç.*, 1952, nº 77, p. 33, nº 78, p. 27, nº 79, p. 22.
BRANDT et KOSSEL. — *J. Biol. Chem.*, 1945, **145**, p. 359.
BRANDT, RYAN et DISKANT. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1945, **67**, p. 1532.
BREEZE et JONES. — *Cereal Chem.*, 1926, **3**, p. 194.
BRESSANI, ARROYAVE et SCRIMSHAW. — *Food Res.*, 1953, **18**, p. 261.
BREWSTER et ALSBERG. — *J. Biol. Chem.*, 1919, **37**, p. 367 ; 1921, **49**, p. 249.
BROHULT. — *Brasserie*, 1953, **78**, p. 39.
BROTHER et OLCOTT. — *Baker's Digest.*, 1947, **21**, p. 97.
BROWN. — *J. Inst. Brew.*, 1907, **13**, p. 394.
BULL. — *Adv. in Enzymol.*, 1941, **1**, Protein Structure, p. 1.
BUNGENBERG DE JONG et KLAAR. — *Cereal Chem.*, 1929, **6**, p. 373 ; 1930, **7**, p. 222 et 587 ; 1931, **8**, p. 449.
BUNGENBERG DE JONG et KLAAR. — *Trans. Faraday Soc.*, 1932, **28**, p. 27 et 798. — *J. Soc. Chem. Ind.*, 1933, **52**, p. 391.
BURE. — *Meun. Franç.*, 1952, **66**, p. 28, **68**, p. 29.
BURK. — *J. Biol. Chem.*, 1938, **124**, p. 49.
BUSHEY. — *South Dakota Agr. Expt. Sta Bull.*, 1924, **210**, p. 713.
CALVERY et REMSEN. — *J. Biol. Chem.*, 1927, **73**, p. 593.
CANNON, MAC MASTERS, WOLF et RIST. — *Trans. AACC.*, 1952, **10**, p. 74.
CARPENTER, HAAS et MILES. — *Agron. J.*, 1952, **44**, p. 420.
CARVIOTORO et coll. — *Cienca Mexico*, 1952, **12**, p. 19.
CASARES. — *Anal. Bromat. Esp.*, 1951, **3**, p. 203.
CATHCART et KILLEN. — *Cereal Chem.*, 1939, **16**, p. 798.
CHABOT. — *Bull. Ecole Meun. Belge*, 1940 *a*, **7**, p. 18 ; 1940 *b*, **7**, p. 33.
CHAMBERLAIN. — *U. S. Dept. Agr. Bur. Chem. Bull.*, 1905, **90**, p. 121. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1906, **28**, p. 1657.
CHIBNALL. — *Proc. Roy. Soc. B.*, 1943, **131**, p. 136.
CHIBNALL. — *J. Int. Soc. Leath Trades Chem.*, 1946, **30**, p. 1.
CHICK. — *Lancet*, 1942, **242**, p. 405.
CHICK, BOAS-FIXSEN, HUTCHINSON et JACKSON. — *Biochem. J.* 1935, **29**, p. 1712.
CHICK, COPPING et SLACK. — *Lancet*, 1946, **250**, p. 196.
CHICK, CUTTING, MARTIN et SLACK. — *Brit. J. Nutrit.*, 1947, **1**, p. 1611.
CHICK et SLACK. — *Brit. J. Nutrit.*, 1948, **2**, p. 205.
CLARK et SCHRYVER. — *Biochem. J.*, 1917, **11**, p. 319.
CLAVER et ARRIAGA. — *Rev. Fac. Agron. Argent.*, 1951, **28**, p. 115.
COBB. — *Misc. Publ. Dep. Agri.*, NSW, 1905.
COHN. — *J. Biol. Chem.*, 1925, **63**, XV-XVI.
COHN, HENDRY et PRENTISS. — *J. Biol. Chem.*, 1925, **63**, p. 721.
COIC. — *C. R. Acad. Agr. Fr.*, 1950 *a*, **36**, p. 231. — *Ann. Agron. Sie. A.*, 1950 *b*, **1**, p. 195. — *Ann. Agron. Sie. A.*, 1952, **3**, p. 417.
COIC et ALEXINSKY. — *C. R. Acad. Agr., Fr.* 1953, **39**, p. 782.
COLVIN et MAC CALLA. — *Canad. J. Res.*, 1949, **27** C, p. 103.
CONN et VENNESLAND. — *J. Biol. Chem.*, 1951, **192**, p. 17.
COOK. — *Canad. J. Res.*, 1931, **5**, p. 389.
COOK et ALSBERG. — *Canad. J. Res.*, 1931, **5**, p. 355.

COOK et POLLOCK. — *J. Inst. Brew.*, 1952, **58**, p. 325.
COOK et ROSE. — *Nature*, 1934, **134**, p. 380. — *Canad. J. Res.*, 1935, **12**, p. 238.
COPPING. — *Nutrit. Abst. Rev.*, 1939, **8**, p. 555.
COSGROVE, DANIELS, GREER, HUTCHINSON, MORAN et WHITEHEAD. — *Nature*, 1952, **169**, p. 966.
CRAMER, LANG, HUBBE et KULICK. — *Bioch. Z.*, 1951, **322**, p. 58.
CROSS et SWAIN. — *J. Ind. Eng. Chem.*, 1924, **16**, p. 49.
CSONKA. — *J. Biol. Chem.*, 1927, **75**, p. 189 ; 1932, **97**, p. 281 ; 1937 *a*, **118**, p. 147. — *Cereal Chem.*, 1937 *b*, **14**, p. 397. — *J. Agr. Res.*, 1939, **59**, p. 765. — *Cereal Chem.*, 1941, **18**, p. 523.
CSONKA et HORN. — *J. Biol. Chem.*, 1931, **93**, p. 677.
CSONKA, HORN et JONES. — *J. Biol. Chem.*, 1930, **89**, p. 267.
CSONKA et JONES. — *J. Biol. Chem.*, 1927, **73**, p. 321 ; 1929, **82**, p. 17 ; 1930, **89**, p. 267.
CSONKA, MURPHY et JONES. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1926, **48**, p. 763.
CUNNINGHAM et ANDERSON. — *Cereal Chem.*, 1950, **27**, p. 344. — *Canad. Gr. J.*, 1951, **6**, p. 52.
CUNNINGHAM. — *Chem. Ind.*, 1953, p. 163.
DAKIN. — *Biochem. J.*, 1918, **12**, p. 290 ; 1919, **13**, p. 398. — *Z. Physiol. Chem.*, 1923, **130**, p. 159. — *J. Biol. Chem.*, 1924, **61**, p. 137.
DANIELSSON. — *Biochem. J.*, 1949, **44**, p. 387.
DANIELSSON et SANDEGREN. — *Acta. Chem. Scand.*, 1947, **1**, p. 917.
DARNODARAN. — *Biochem. J.*, 1931, **25**, p. 190.
DAS et BISWAS. — *Sci. Cult. India*, 1953, **19**, p. 158.
DE DEKEN, MORTIER et WIAME. — *Biochem. Biophys. Acta*, 1953, **10**, p. 488.
DEMPER, HLYNKA et WINKLER. — *Cereal Chem.*, 1952, **29**, p. 39.
DILL et ALSBERG. — *J. Biol. Chem.*, 1925, **65**, p. 279.
DISKANT. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1945, **67**, p. 1532.
DONARD et LABBE. — *C. R. Acad. Sc.*, 1902, **135**, p. 744 ; 1903, **137**, p. 264.
DOTY, BERGDOLL et MILES. — *Cereal Chem.*, 1943, **20**, p. 113.
DOTY, BERGDOLL, NASH et BRUNSON. — *Cereal Chem.*, 1946, **23**, p. 199.
DUESO TELLO. — *An. Bromatol.*, 1953, **5**, p. 203.
DUSSEN (VAN DER) et MAASKANT. — Chemistry of amino-acids and Proteins Thomas Springfield. III. 1938.
DUSTIN, SCHRAM, MOORE et BIGWOOD. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1953, **35**, p. 1137.
DUVICK. — *J. Bot.*, 1952, **39**, p. 656.
DYER, TAYLOR et HAMENCE. — 1942, cités dans KENT-JONES 1947, p. 94.
EARLE, CURTIS et HUBBARD. — *Cereal Chem.*, 1946, **23**, p. 504.
ELLIOTT et WILLIAMS. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1939, **61**, p. 718.
ELSWORTH et PHILIPPS. — *Biochem. J.*, 1938, **32**, p. 836.
ERRERA, VOGELS et HAUSS. — *C. R. Acad. Sc.*, 1931, **193**, p. 959. — *J. Chim. Phys.*, 1932, **29**, p. 67.
ERRERA. — *J. Chim. Phys.*, 1932, **29**, p. 124.
ETO. — *J. Biochem.*, Japan, 1924, **3**, p. 373.
EVA et ANDERSON. — *Cereal Chem.*, 1944, **21**, p. 560.
EVANS, FOSTER et CROSTON. — *J. Ind. Eng. Chem.*, 1945, **37**, p. 175.
FELIX et REINDL. — *Z. Physiol.*, 1932, **205**, p. 11.
FELLENBERG (Von). — *Mitt. Geb. Lebens. Unt. Hyg.*, 1919, **10**, p. 229.
FIDANZA, SCARDI et VIRGILIO. — *Bull. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 1952, **28**, p. 1316.
FINK et KUNISH. — *Woch. Schr. Brau.*, 1937, **54**, p. 193.
FINNEY et YAMAZAKI. — *Cereal Chem.*, 1946, **23**, p. 416.
FISCHER et ABDERHALDEN. — *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 1907, **40**, p. 3544.
FISCHER et HALTON. — *Cereal Chem.*, 1936, **13**, p. 575.
FLEURENT. — *C. R.*, 1896 *a*, **123**, p. 327 ; 1896 *b*, **123**, p. 775.
FLYNN, ZUBER, LEWEKE, GRAINGER et HOGAN. — *Cereal Chem.*, 1954, **31**, p. 217.

FOLIN et LOONEY. — *J. Biol. Chem.*, 1922, **51**, p. 421.
FOLIN et MARENZY. — *J. Biol. Chem.*, 1929 *a*, **83**, p. 89 ; 1929 *b*, **83**, p. 103.
FORD. — *Chem. Ind.*, 1941, **60**, p. 875.
FOSTER. — *J. Physiol. Coll. Chem.*, 1949, **53**, p. 175.
FOSTER et TSI-YANG-YUI. — *Cereal Chem.*, 1950, **27**, p. 477.
FRAPS. — *Texas Agr. Expt. Sta. Bull.*, 1931, p. 422.
FREILICH et FREY. — *Cereal Chem.*, 1943, **20**, p. 301.
FRENCH et MATTILL. — *Cereal Chem.*, 1935, **12**, p. 365.
FREY. — *Cereal Chem.*, 1951 *a*, **28**, p. 123 ; 1951 *b*, **28**, p. 506 ; 1952, **29**, p. 77.
FURTH et MINNIBECK. — *Biochem. Z.*, 1932, **250**, p. 18.
FURTH, SCHOLL et HERMANN. — *Biochem. Z.*, 1932, **251**, p. 404.
GARDNER. — *J. Min. Agric.*, avril 1950, p. 1.
GASTLER et HALVERSON. — *Proc. Dakota Acad, Sc.*, 1952, **31**, p. 182.
GEDDES. — *Canad. J. Res.*, 1929, **1**, p. 528 ; 1930, **2**, p. 65.
GEDDES et GOULDEN. — *Cereal Chem.*, 1930, **7**, p. 527.
GEERDES et HARRIS. — *Cereal Chem.*, 1952, **29**, p. 132.
GEIGER, COURTNEY et GEIGER. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1952, **41**, p. 74.
GEOFFROY et LABOUR. — *Bull. Ass. Chim.*, 1936, **53**, p. 1.
GERBRANDT. — Thèse Univers. Alberta Edmonton Alberta 1946.
GERICKE. — *Science*, 1930, **71**, p. 73.
GERRY, GARRICK et HAUGE. — *Poultry. Sc.*, 1948, **27**, p. 161.
GERSHZON. — *Coll. J. USSR.*, 1937, **3**, p. 897.
GILBERT, DURAND et GASSELIN. — *Bull. Soc. Chim., Fr.*, 1936, **3**, p. 2237.
GIRAL et GRAVIOTO. — *Ciencia*, 1941, **2**, p. 204.
GIRARD et LINDET. — Le froment et sa mouture. Gauthier Villars éd. Paris, 1903.
GORTNER et DOHERTY. — *J. Agr. Res.*, 1918, p. 389.
GORTNER, HOFFMANN et SINCLAIR. — *Cereal Chem.*, 1929, **6**, p. 1.
GORTNER et MacDONALD. — *Cereal Chem.*, 1944, **21**, p. 324.
GOTTENBURG et ALSBERG. — *J. Biol. Chem.*, 1927, **73**, p. 581.
GRACE. — *Canad. J. Res. C.*, 1944, **22**, p. 280.
GRASSMANN. — *Naturwiss.*, 1951, **38**, p. 200.
GRAVES. — *Chem. Ind.*, 1945, **64**, p. 146 ; 1946, **65**, p. 261.
GREAVES .— *Univ. Calif. Publ. Physiol.*, 1911, **4**, p. 31.
GREAVES et BRACKEN. — *Cereal Chem.*, 1937, **14**, p. 578.
GREAVES et NELSON. — *J. Agr. Res.*, 1925, **31**, p. 183.
GREENBURG et SCHMIDT. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Méd.*, 1923-24, **21**, p. 281.
GREENE et BLACK. — *J. Biol. Chem.*, 1944, **155**, p. 1.
GREENHUT, SCHWEIGERT et ELVEHJEM. — *J. Biol. Chem.*, 1946 *a*, **162**, p. 69 ; 1946 *b*, **165**, p. 325.
GREER et GRINDLEY. — *J. Agric. Sc. G. B.*, 1954, **45**, p. 125.
GREW et BAILEY. — *Cereal Chem.*, 1927, **4**, p. 230.
GRIST, LONGMANS et GREEN. — *Coll. Tropic. Agric. Ser.*, 1 vol., 1953, 332 p.
GRÖH et FRIEDL. — *Biochem. Z.*, 1914, **65**, p. 154.
GUASTALLA. — Communication privée, 1953.
GUBLER et GRAVES. — *Food. Res.*, 1942, **7**, p. 405.
GUESS. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1900, **22**, p. 263.
GUILLEMET et COLINEAU. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1945, **27**, p. 225.
GUILLEMET et GUILBOT. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1945, **27**, p. 49.
GUILLEMET et JACQUOT. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1944, **26**, p. 324.
GUILLEMET et SCHELL. — *C. R. Soc. Biol.*, 1934, **116**, p. 402.
GUILLEMET, SONNTAG et GUILBOT. — *C. R. Acad. Agr.*, 1942, **28**, p. 491.
GYLLING et VON EULER. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1952, **34**, p. 1.
GUTHRIE. — *Agric. Gaz. N. S. Wales*, 1896, **7**, p. 583.
HAGBERG. — *Bull. Ecol. Meun. Belge*, 1950, n° 3, p. 69 et n° 4, p. 93 ; 1952, n° 1, p. 1.
HALTON. — *J. Agr. Sci.*, 1924, **14**, p. 587.
HALVERSON, GRAFIUS et MOXON. — *Cereal Chem.*, 1952, **29**, p. 18.

HAMILTON, NEVENS et GRINDLEY. — *J. Biol. Chem.*, 1921, **48**, p. 249.
HANSEN, BRIMHALL et SPRAGUE. — *Cereal Chem.*, 1946, **23**, p. 329.
HANSSEN. — *Vortrag in Detmold.*, 1952, **16**, p. 6.
HARDY. — *Rep. Brit., Assoc.*, 1909, p. 784.
HARRIS. — *Cereal Chem.*, 1931 *a*, **8**, p. 47 ; 1931 *b*, **8**, p. 113 ; 1931 *c*, **8**, p. 190 ; 1932, **9**, p. 147 ; 1937, **14**, p. 695 ; 1938, **15**, p. 80.
HARRIS. — *J. Inst. Brew.*, 1952, **58**, p. 417.
HARRIS et BAILEY. — *Cereal Chem.*, 1937, **14**, p. 182.
HARRIS et FROKJER. — *Cereal Chem.*, 1952, **29**, p. 212.
HARRIS et JOHNSON. — *Cereal Chem.*, 1940, **17**, p. 232 ; 1941, **18**, p. 395.
HARRIS, OLSON et JOHNSON. — *Cereal Chem.*, 1942, **19**, p. 748.
HARRIS et POLLOCK. — *J. Inst. Brew.*, 1953, **59**, p. 28.
HARRIS, SIBBITT et BANASICK. — *Cereal Chem.*, 1948, **25**, p. 255.
HAUGAARD et JOHNSON. — *C. R. Trav. Lab. Carlsberg*, 1930, **18**, p. 1.
HEATHCOTE. — *Brit. J. Nutrit.*, 1950, **4**, p. 145.
HEILMER. — *Brauwis, Dtsch.*, 1952, **5**, p. 89.
HERD (Van der). — *Cereal Chem.*, 1931, **8**, p. 1.
HESS. — *AACC. Transactions*, 1953 *a*, **11**, p. 153.
HESS. — *Getreide Mehl*, 1953 *b*, **3**, p. 81.
HINTON. — *Proc. Roy. Soc. London.*, B. 1947, **134**, p. 418.
HINTON. — *Cereal Chem.*, 1953, **30**, p. 441.
HITES. — *Baker's Digest*, 1947, **21**, p. 36.
HIXON. — *Jowa. Corn. Res. Inst. 3d. Ann. Rep.*, 1938, p. 61.
HLYNKA. — *Cereal Chem.*, 1949, **26**, p. 307.
HLYNKA et BASS. — *Cereal Chem.*, 1949, **26**, p. 513.
HLYNKA et ANDERSON. — *Cereal Chem.*, 1951, **28**, p. 136.
HOAGLAND. — *J. Ind. Eng. Chem.*, 1911, **3**, p. 838.
HODSON et KRUEGER. — *Arch. Biochem.*, 1947, **12**, p. 435.
HOFFMANN et GORTNER. — *Coll. Symp. Monog.*, 1925, **2**, p. 209 ; *Cereal Chem.*, 1927, **4**, p. 221.
HOFMANN et NIGGEMANN. — *Brauwiss.*, 1954, nº 3, p. 41.
HOLME et SPENCER. — *Cereal Chem.*, 1952, **29**, p. 251.
HOPKINS. — *J. Inst. Brew.*, 1930, **36**, p. 297.
HOPKINS et BURNS. — *J. Inst. Brew.*, 1929, **36**, p. 16.
HOPKINS et KRAUSE. — Biochem. Appl. to malting and brewing. Allen and Unwin. Ed. London 1947.
HOPKINS, SMITH et EAST. — *Ill. Agr. Exp. Sta. Bull.*, 1903 *a*, p. 87. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1903 *b*, **25**, p. 1166.
HORN, JONES et BLUM. — *J. Biol. Chem.*, 1946, **166**, p. 313 ; 1947 *a*, **169**, p. 71 ; 1947 *b*, **169**, p. 739 ; 1947 *c*, **170**, p. 719 ; 1948 *a*, **172**, p. 149 ; 1948 *b*, **176**, p. 679 ; 1949 *a*, **177**, p. 697 ; 1949 *b*, **180**, p. 695.
HOVE, CARPENTER et HARREL. — *Cereal Chem.*, 1945, **22**, p. 287.
HOVE et HARREL. — *Cereal Chem.*, 1943 *a*, **20**, p. 141. — 29th. *Ann. Meet. AACC*, 1943 *b*.
HULLET. — *New Zealand J. Sc. Techn.*, 1940, **22**, p. 44.
HULLET et STERN. — *Cereal Chem.*, 1941, **18**, p. 562.
HULTIN. — *Svensk. Kem. Tidskr.*, 1949, **61**, p. 281.
JACOBS. — The Chemistry and Technology of Food and Food Products, 1951, vol. 1, p. 193, Interscience publ. INC N. Y. LTP London ; *Cereal Chem.*, 1952, **29**, p. 476.
JACQUOT. — *J. Sc. Pain*, Paris, 1948, p. 397.
JACQUOT, MATTET et FRIDENSON. — *Ann. Nutrit. Aliment.*, 1947, **1**, p. 157.
JACQUOT, TREMOLIÈRES, GUILLEMET et ERFMAN. — *Bull. Acad. Med.*, 1944, nº 31, 32, p. 608.
JAGAT, JIBAN et GHOSH. — *Ind. J. Physiol. All. Sci.*, 1953, **7**, p. 10.
JAGO. — The Technology of Breadmaking, Simkin Kent Cº, 1911.
JAMES et HUBER. — *Cereal Chem.*, 1927, **4**, p. 449.

JAVILLIER et DJELATIDES. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1934, **16**, p. 1542.
JENSEN. — *Acta Chemica Scandin*, 1952 *a*, **6**, p. 771. — IIe Intern. Congress. Ferment. Ind. Knoke le Zoute, 1952 *b*, p. 45. *Brauerei*, 1953 *a*, **7**, p. 222. — *Brygmesteren*, 1953 *b*, **10**, p. 37. — *Europ. Brew. Conv. Proc. Congress*, Nice, 1953 *c*, p. 74.
JODIDI. — *J. Agr. Res.*, 1925, **30**, p. 587 ; 1927, **34**, p. 308.
JOHN et FINKS. — *J. Biol. Chem.*, 1920, **42**, p. 569.
JOHNSON et PALMER. — *J. Agric. Res.*, 1934, **49**, p. 169.
JONES. — *Cereal Chem.*, 1937, **14**, p. 771.
JONES, CALDWELL et WIDNESS. — *J. Nutrit.*, 1948, **35**, p. 640.
JONES et CSONSKA. — *J. Biol. Chem.*, 1927, **74**, p. 427 ; 1928, **78**, p. 289.
JONES, DIVINE et GERSDORFF. — *Cereal Chem.*, 1942, **19**, p. 819.
JONES et GERSDORFF. — *J. Biol. Chem.*, 1923, **58**, p. 117 ; 1925, **64**, p. 241 ; 1927, **74**, p. 415. — *Cereal Chem.*, 1941, **18**, p. 417.
JONES, GERSDORFF et MOELLER. — *J. Biol. Chem.*, 1924, **61**, p. 137 et **62**, p. 183.
JONES et MOELLER. — *J. Biol. Chem.*, 1928, **79**, p. 429.
JONES et PERKINS. — *J. Biol. Chem.*, 1925, **62**, p. 557.
JONES et WIDNESS. — *J. Nutrit.*, 1946, **31**, p. 675.
JONES et WILSON. — *Cereal Chem.*, 1928, **5**, p. 473.
JORGENSEN. — Kornet Kem. Korn. Alp. Jorgensen Forlag. Copenhagen. 1943.
JORGENSEN. — Studies on the nature of the bromate effect. Humphrey Milford. Londres 1945.
KALNING. — *Z. Ges. Getreid*, 1917, **9**, p. 167.
KAPELLER et ADLER. — *Biochem. Z.*, 1932, **252**, p. 185.
KASTING. — Thèse Univers. Alberta Edmonton Alberta 1948.
KAWADA, SHOJI, TEZUKA, TAKAI et HAYAKAWA. — *Japan J. Nutrit.*, 1952, **10**, p. 12.
KELLEY, HUNTER et STERGES. — *Ind. Eng. Chem.*, 1946, **18**, p. 319.
KEMPT et RIDEAL. — *Proc. Roy. Soc.*, Londres, 1934, *A*. **147**, p. 1.
KENT-JONES. — Thèse Univ. Londres, 1926.
KENT-JONES et AMOS. — *Mod. Cer. Chem.* The Northern Publ. Co N. Y., 1947.
KENT et MACHEBŒUF. — *Eur. Brew. Conv.*, 1949, **1**, p. 1.
KICK. — *Cereal Chem.*, 1939, **16**, p. 441 ; 1940, **17**, p. 473 ; 1941, **18**, p. 349.
KICK et WILLIAMS. — *Bull. Nat. Res. Connec.* nº 112, 1945.
KIGER. — La Biscuiterie. Girardot et Cie Edit. Paris 1951, 1 vol., 560 p.
KLEIN, HARROW, PINE et FUNCK. — *Amer. J. Physiol.*, 1926, **76**, p. 237.
KLEINSCHMITT. — *Am. J. Physiol.*, 1907, **19**, p. 117. — *Z. Physiol. Chem.*, 1907-08, **54**, p. 110.
KLIMENKO et NEDBAJ. — *Ukrain. Biokhim. Zh.*, 1951, **23**, p. 154.
KNIAGINICEV et GORELKINA. — *C. R. Acad. Sc. USSR*, 1937, **16**, p. 419.
KNYAGINICHEV. — *Bull. App. Bot. Gen. Plant. Breed. USSR.* ser. 3, 1936, **15**, p. 5 et 55.
KOLESSOV. — *Biokimia*, 1951, **16**, nº 4.
KONDO et HAYASHI. — *Mem. Coll. Agro. Kyoto. Imp. Univ.*, 1926 *a*, **2**, p. 37.
KONDO et HAYASHI. — *Mem. Coll. Agro. Kyoto. Imp. Univ.*. 1926 *b*, **2**, p. 55 ; 1931, **11**, p. 21
KONDO, HAYASHI et MATSUSHITA. — *Mem. Coll. Agri. Kyoto. Imp. Univ.*, 1926, **2**, p. 71.
KONDO et HAYASKI. — *Mem. Coll. Agri. Kyoto. Imp. Univ.*, 1928, **5**, p. 1.
KONDO et Ito. — *J. Chem. Soc.*, Japan, 1930, **51**, p. 67.
KONDO et OWADA. — *Bull. Res. Inst. Food Sci.*, 1952, p. 19 ; dans *Chem. Abstr.*, 1954, **46**, p. 7141 *b*.
KONIG et BARTSCHAT. — *Z. Unt. Lebensm.*, 1923, **46**, p. 321.
KOROS. — *Magyar Kem. Folyoirat.*, 1950, **56**, p. 131.
KOSMIN. — *Das Mühlenlab*, 1934, **4**, p. 109.

KOSMIN et PEPZOWA. — *Das Mühlenlab.*, 1934 *a*, **4**, p. 153 ; 1934 *b*, **11**, p. 154.
KOSSEL et KUTSCHER. — *Z. Physiol. Chem.*, 1901, **31**, p. 165.
KOSUTANY. — *J. Lander*, 1903, **51**, p. 139. — *Der Ungar Weis. und das Ungar Mehl.* Budapest 1907.
KRAUS. — *J. Biol. Chem.*, 1928, **80**, p. 543.
KREJCI et SVEDBERG. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1935, **57**, p. 946.
KRETOWITZ et RIAZANCEVA. — *C. R. Acad. Sc.* USSR., 1935, **3**, p. 409.
KUDRJASHOVA et KOLOBKOVA. — *Dokl. Akad. Nauk.*, SSSR, 1953, **91**, p. 1365 ; dans *Bull. Analyt.* CNRS, 1954, **15**, 2e part., p. 683.
KUHLMAN. — *Nature*, 1937, **140**, p. 119.
KUHNAU. — *Z. Lebensm. Unter. Forsh.*, 1950, **6**, p. 434.
KUIKEN, NORMAN, LYMAN, HALE et BLOTTER. — *J. Biol. Chem.*, 1943, **151**, p. 615.
KULMAN. — *Coll. J.*, USSR., 1937, **3**, p. 863.
KUTSCHER. — *Z. Physiol. Chem.*, 1903, **38**, p. 111.
LAINE. — *Suom. Kemi*, 1939, **12 B.**, p. 23.
LAINE. — *Suom. Kemi*, 1945, **18**, p. 7.
LANGSTEIN. — *Z. Physiol. Chem.*, 1902-03, **37**, p. 508.
LANN et POLSON. — *Biochem. J.*, 1936, **30**, p. 528.
LARMOUR. — *J. Agr. Res.*, 1927, **35**, p. 1091.
LARMOUR et SALLANS. — *Canad. J. Res.*, 1932, **6**, p. 38.
LASAFFRE. — *Bull. Ec. Meun. Belge*, 1953, p. 69.
LATSHAW et MILLER. — *J. Agr. Res.*, 1924, **27**, p. 845.
LAVINE. — *J. Biol. Chem.*, 1943, **151**, p. 281 ; 1945, **156**, p. 401.
LAWS et FRANCE. — *Cereal Chem.*, 1948, **25**, p. 231.
LECLERC. — *Cereal Chem.*, 1932, **9**, p. 600.
LEJEUNE. — *Bull. Soc. Chim., Fr.*, 1952, nº 3-4, p. 240. — *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234**, p. 1800.
LENARSKIJ. — *Dokl. Akad. Nauk.* SSSR., 1951, **78**, p. 741.
LEVENE et LAFORGE. — *Ber.*, 1910, **43**, p. 164.
LEVI et ANDERSON. — *Gr. Res. Lab. Report*, 1949.
LEWIS, HART et ELVEHJEM. — *J. Nutrit.*, 1951, nº 1, p. 113.
LIGHT et FREY. — *Cereal Chim.*, 1943, **20**, p. 645.
LINDET et AMMAN. — *Bull. Soc. Chim.*, 1907, **1**, p. 968.
LINDLEY. — *Biochem. J.*, 1948, **42**, p. 481.
LJUNGDAHL et SANDEGREN. — *Brauerei*, 1953, **7**, p. 222. — *Eur. Brew. Conv. Proc. Congress.*, Nice, 1953 *b*, p. 85.
LONG et SHERBAKOFF. — *Agron. J.*, 1951, **43**, p. 320.
LONTIE, CRÈVECŒUR et DULCINO. — *Med. Chem. Ver.*, 1954, **16**, p. 53.
LONTIE, RONDELET et DULCINO. — *Europ. Brew. Conv. Proc. Congress.*, Nice 1953, p. 33.
LOZSA. — *Agrokem. s. Talajtan*, 1953, **2**, p. 147, dans *Biol. Abstr.*, 1954, **28**, p. 22 050 et *Chem. Abstr.*, 1954, **48**, p. 295.
LUERS et LANDAUER. — *Z. Electrochem*, 1922, **28**, p. 341.
LUERS et OSTWALD. — *Kolloïd. Z.*, 1920, **27**, p. 34.
LUERS et SIEGERT. — *Biochem. Z.*, 1924, **144**, p. 467.
LUGG. — *Biochem. J.*, 1938, **32**, p. 2123 ; 1939, **33**, p. 110.
LUNDGREN. — U. S. Patent, 1947.
LUSENA. — *Canad. J. Res.*, 1950 *a*, **28**, p. 234 .— *Cereal Chem.*, 1950 *b*, **27**, p. 167 ; 1951, **28**, p. 400.
LYMAN et KUIKEN. — *Texas Agr. Exp. Sta. Bull.*, 1949, p. 708.
MacCALL, JURGENS, HOFFPAU, PONS, STRAK et CUCULLU. — *J. Agr. Food. Chem.*, 1953, **1**, p. 988.
MacCALLA. — *Canad. J. Res.*, 1949, **27***C*, p. 103. — *Trans. Roy. Soc. Canad Sér.*, 1951, **45**, p. 69.
MacCALLA et GRALEN. — *Nature*, 1940, **146**, p. 60. — *Canad. J. Res.*, 1942, **20***C*, p. 130.

MacCalla et Rose. — *Canad. J. Res.*, 1935, **12***C*, p. 346.
MacCollum. — The Newer Knowledge of Nutrit. 1re édit., 1914.
MacCollum et Simmonds. — *J. Biol. Chem.*, 1917, **32**, p. 347.
MacElroy, Clandinin, Lobay et Pethybridge. — *J. Nutrit.*, 1949, **37**, p. 329.
Mac Leod. — *J. Inst. Brew.*, 1951, **57**, p. 163.
Mac Pherson. — *Biochem. J.*, 1946, **40**, p. 470.
Mangels. — *N. Dakota. Agron. Exp. Sta. Bull.*, 1930, **233**, p. 53.
Mangels et Martin. — *Cereal Chem.*, 1935, **12**, p. 149.
Marais et Smuts. — *Onderstepoort J. Vet. Sc. An. Ind.*, 1940, **15**, p. 225.
Martin. — *J. S. CI.*, 1920, **39**, p. 246.
Martin et Synge. — *Biochem. J.*, 1941, **35**, p. 294.
Mason et Palmer. — *J. Biol. Chem.*, 1934, **107**, p. 131.
Massart. — *Fermentation*, 1946, nº 1-3, p. 1 et nº 4-6, p. 23.
Matet, Sonntag et Fridenson. — Travail inédit, 1947.
Matsuyama et Mori. — *J. Chem. Soc. Jap.*, 1923, **44**, p. 377.
May et Rose. — *J. Biol. Chem.*, 1922, **54**, p. 213.
Maynard, Tronda et Chen. — *J. Biol. Chem.*, 1923, **55**, p. 145.
Mecham et Olcott. — *Ind. Eng. Chem.*, 1947, **39**, p. 1023.
Meyer. — *Food. Ind.*, 1949, p. 86.
Michel, Bozzi et Tichadou. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1947, **29**, p. 884.
Middleton, Coffman, Moseman et Bell. — *Agron. J. U.S.A.*, 1954, **46**, p. 282.
Miller. — *Biochem. J.*, 1935, **29**, p. 2344.
Miller, Aurand et Flach. — *Science*, 1950, **112**, p. 57.
Miller, Seiffe, Shellenberger et Miller. — *Cereal Chem.*, 1950, **27**, p. 96.
Mills. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1954, **14**, p. 274.
Mitchell. — *J. Biol. Chem.*, 1924, **58**, p. 905. — *Ind. Eng. Chem.*, 1944, **16**, p. 696.
Mitchell et Beadles. — *Science*, 1944, **99**, p. 129. — *J. Nutrit.*, 1949, **39**, p. 463.
Mitchell et Block. — *J. Biol. Chem.*, 1946, **163**, p. 599.
Mitchell et Carman. — *J. Biol. Chem.*, 1924, **60**, p. 613 ; 1926, **68**, p. 183.
Mitchell, Hamilton et Beadles. — *J. Nutrit.*, 1952, **48**, p. 461.
Mitchell et Smuts. — *J. Biol. Chem.*, 1932, **95**, p. 263.
Mitchell et Villegas. — *J. Dairy Sc.*, 1923, **6**, p. 222.
Moir. — *Chem. Ind.*, 1942, **61**, p. 17.
Moran. — *Nature*, 1945, **155**, p. 205.
Moran et Drummond. — *Lancet.*, 1945, **248**, p. 698.
Morgan et King. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1926, **23**, p. 353.
Morgan, King, Boyden et Petro. — *J. Biol. Chem.*, 1931, **90**, p. 771.
Morries et Stuckey. — *Analyst.*, 1953, **78**, p. 636.
Morris. — *J. Dairy. Res.*, 1934, **5**, p. 108.
Morris, Alexander et Pascoe. — *Cereal Chem.*, 1945, **22**, p. 351 ; 1946, **23**, p. 540.
Morrisson. — Feeds and Feedings 20th. Ed. NY., 1947.
Moyer et Whitehead — *Proc. South. Dakot. Ac. Sc.*, 1951, **30**, p. 104.
Moyer et Whitehead. — *Proc. Dakota Ac. Sc.*, 1952, **31**, p. 185.
Murlin, Marshall et Kochakian. — *J. Nutrit.*, 1941, **22**, p. 573.
Murphy et Jones. — *J. Biol. Chem.*, 1926, **59**, p. 85.
Myers et Working. — *Cereal Chem.*, 1944, **21**, p. 32.
Nagy, Weidlein et Hixon. — *Cereal Chem.*, 1941, **18**, p. 514.
Naim. — *Arch. Farm. Bioq. Tucum*, 1948, **4**, p. 5.
Nakashima. — *J. Biochem. Japan.*, 1926, **6**, p. 55.
Neglia, Hess et Sullivan. — *J. Biol. Chem.*, 1938, **125**, p. 183.
Neuberger. — *J. Biol. Chem.*, 1945, **158**, p. 717.
Neumann et Pelshenke. — *Brotg. Biot.*, Paul Parey. Berlin, 1943.
Neurath. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1939, **61**, p. 1841.

NEWTON. — *Canad. J. Agri. Sci.*, 1953, **33**, p. 350.
NICOLET et SHINOIN. — *J. Biol. Chem.*, 1942, **142**, p. 139.
NIHLEN et AYRAPA. — Cité par SCRIBAN, Thèse 1951.
NOLLAU. — *J. Biol. Chem.*, 1915, **21**, p. 611.
NORDIN et SPENCER. — *Cereal Chem.*, 1952, **29**, p. 29.
OFELT. et EVANS. — *Industr. Eng. Chem.*, 1949, **41**, p. 830.
OGATA et KIKUO. — *J. Jap. Soc. Food Nutrit.*, 1952, **4**, p. 182 ; dans *Biol. Abstr.*, 1954, **28**, p. 20 466.
OLCOTT. — *Cereal Chem.*, 1950, **27**, p. 514.
OLCOTT et BLISH. — *Trans. AACC.*, 1944, **2**, p. 20.
OLCOTT et MECHAM. — *Cereal Chem.*, 1947, **24**, p. 407.
OLCOTT, SAPIRSTEIN et BLISH. — *Cereal Chem.*, 1943, **20**, p. 87.
OLSEN. — *Wash. Agr. Exp. Sta. Bull.*, 1917, p. 144.
OLSON. — *J. Ind. Eng. Chem.*, 1913, **5**, p. 917 ; 1914, **6**, p. 211.
ORLOVA, PONOMAREV et TONGUR. — *Biokhimija, SSSR*, 1954, **19**, p. 341 ; dans *Bull. Analyt.* CNRS., 1955, **16**, p. 994.
OSBORNE. — *Amer. Chem. J.*, 1891, **13**, p. 385 ; 1892, **14**, p. 212. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1895, **17**, p. 539.
OSBORNE. — *J. Amer. Soc.*, 1897, **19**, p. 525. — The Proteins of Wheat kernel. Carnegie Inst. Washington, 1907. — *Biol. Chem. exper. Pharmak.*, 1910, **10**, p. 62.
OSBORNE et CAMPBELL. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1896, **18**, p. 542 ; 1900, **22**, p. 379.
OSBORNE et CLAPP. — *Amer. J. Physiol.*, 1907, **19**, p. 117 ; 1908, **20**, p. 477.
OSBORNE et GILBERT. — *Am. J. Physiol.*, 1906, **15**, p. 333.
OSBORNE et GUEST. — *J. Biol. Chem.*, 1911, **9**, p. 425.
OSBORNE et HARRIS. — *Conn. Agr. Exp. Sta.*, 1901, p. 365. — *Z. Physiol. Chem.*, 1902, **36**, p. 85.
OSBORNE et JONES. — *Amer. J. Physiol.*, 1910, **26**, p. 305.
OSBORNE, LEAVENWORTH et BRAUTLECHT. — *Am. J. Physiol.*, 1909, **23**, p. 180.
OSBORNE et LIDDLE. — *Amer. J. Physiol.*, 1910, **26**, p. 295.
OSBORNE et MENDEL. — *J. Biol. Chem.*, 1914, **17**, p. 235 ; 1914 *a*, **18**, p. 1 ; 1917, **29**, p. 69 ; 1918, **34**, p. 521 ; 1919, **37**, p. 557.
OSBORNE, MENDEL et FERRY. — *J. Biol. Chem.*, 1919, **37**, p. 223.
OSBORNE, VAN SLYKE, LEAVENWORTH et VINOGRAD. — *J. Biol. Chem.*, 1915, **22**, p. 259.
PADOA. — *Ann. Chim. Applicata*, 1938, **27**, p. 544.
PASCOE, GORTNER et SHERWOOD. — *Cereal Chem.*, 1930, **7**, p. 195.
PATTERSON, GEIGER, MIZELL et HARRIS. — *J. Res. Nat. Bur. Stand.*, 1941, **27**, p. 89.
PATTON. — *J. Biol. Chem.*, 1935, **108**, p. 267.
PEARSALL et ERWING. — *Biochem J.*, 1924, **18**, p. 329.
PELSHENKE. — *Ernäh. Pflanze.*, 1937, **33**, p. 321.
PENCE. — 38th. *Ann. Meet. AACC.*, 1953 *a*, p. 32. — *Cereal Chem.*, 1953 *b*, **30**, p. 328.
PENCE et ELDER. — *Cereal Chem.*, 1953, **30**, p. 275.
PENCE, ELDER et MECHAM. — *Cereal Chem.*, 1951, **28**, p. 95.
PENCE, MECHAM, ELDER, LEWIS, SNELL et OLCOTT. — *Cereal Chem.*, 1950, **27**, p. 335.
PENCE, MOHAMMAD et MECHAM. — *Cereal Chem.*, 1953, **30**, p. 115.
PENCE et OLCOTT. — *Cereal Chem.*, 1952, **29**, p. 292.
PENCE, WEINSTEIN et MECHAM. — *Cereal Chem.*, 1954 *a*, **31**, p. 29 ; 1954 *b*, **31**, p. 303 ; 1954 *c*, **31**, p. 396.
PEREIRA. — *Agron. Lusit.*, 1945, **7**, p. 245.
PEREIRA. — *Cereal Chem.*, 1952, **29**, p. 478.
PHILLIPS, cité par KENT JONES. — 1947, p. 93.

PINCKNEY. — *Cereal. Chem.*, 1949, **26**, p. 423.
PREECE. — *Brewer's Guild. J.*, 1952, **38**, p. 127.
PRINCE. — *Agronom. J. U.S.A.*, 1954, **46**, p. 185.
PUTNAM, BRIGGS et GORTNER. — The electrophoresis of gliadine solutions, Chicago, Ill, 1942.
QUENSEL, 1941 (non publié) — cité par SCRIBAN. Thèse 1951.
QUENSEL. — Inaugural Dissert. Uppsala., 1942.
QUENSEL et SVEDBERG. — *C. R. Trav. Lab. Carlsberg. Ser. Chim.*, 1937, **22**, p. 441.
RAO et SWAMINATHAN. — *Bull. Centr. Food Tech. Inst. Mysore*, 1953, **2**, p. 262.
READ et TOTTINGHAM. — *J. Biol. Chem.*, 1917, **31**, p. 295.
RENNER, BENTLEY et MCELROY. — *Proc. Soil Sci. Soc. Amer.*, 1953, **17**, p. 270.
REZNICHENKO. — *Biokhimija*, SSSR., 1951, **16**, p. 579.
RICE et RAMSTADT. — *Cereal Chem.*, 1950, **27**, p. 238.
RICHARDSON. — *Bull. U. S. Bur. Chem.*, 1886.
RICH. — *Cereal Chem.*, 1933, **10**, p. 222 ; 1936, **13**, p. 522 ; 1938, **15**, p. 596.
RIESEN, SCHWEIGERT et ELVEHJEM. — *J. Biol. Chem.*, 1946, **165**, p. 347.
RIGBY. — Thèse Univers. Alberta. Edmonton Alberta., 1944.
ROCHE et MOURGE. — *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137**, p. 766.
ROKITA. — *Europ. Brew. Conv. Proc. Congr.*, Nice, 1953, p. 214.
RONA et MICHAELIS. — *Biochem. Z.*, 1910, **28**, p. 193.
RONDELET et LONTIE. — *Europ. Brew. Conv. Proc. Congress*, Nice, 1953. p. 22.
ROSE et ANDERSON. — *Can. J. Res.*, 1936, **14***C*, p. 109.
ROSE et COOK. — *Can. J. Res.*, 1935, **12**, p. 63.
ROSENBERG, ROHDENBURG et BALDINI. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1954, **49**, p. 263.
ROSENHEIM et KAJIURA. — *Amer. J. Physiol.*, 1908, **20**, p. 36.
ROSS, GARRIGUS, HAMILTON et EARLY. — *Animal Science*, 1954, **13**, p. 433.
ROSTFORER, KOCHAKIAN et MURLIN. — *J. Nutrit.*, 1942, **26**, p. 123.
ROUSIER. — *Thèse Doct. Pharm.* Paris, 1944.
ROUSSEAUX et SIROT. — *C. R.*, 1913, **156**, p. 723 ; 1918, **161**, p. 190.
RUDRA et CHOWDHURY. — *Nature*, 1950, **166**, p. 568.
SAGI. — *A. A. C. C. Transactions*, 1954, **12**, p. 56. — 38th *Ann. Meet. A.A.CC.*, 1953, p. 37.
SANDEGREN. — *Eur. Brew. Conv. Scheveningen.*, 1947, **1**, p. 28. — *Lucerne*, 1949, **1**, p. 78.
SANDEGREN, EKSTROM et HABERL. — *Mitt. Versuch. Garungs*, 1953, **7**, p. 140.
SANDEGREN, SUOMINEN et EKSTROM. — *Acta Chem. Scand.*, 1949, **3**, p. 1027.
SANDSTEDT et BLISH. — *Cereal Chem.*, 1933, **10**, p. 359.
SANDSTEDT et OFELT. — *Cereal Chem.*, 1940, **17**, p. 714.
SAUBERLICH et BAUMANN. — *J. Biol. Chem.*, 1949, **177**, p. 545.
SAUBERLICH, WAN-YUIN-CHANG et SALMON. — *J. Nutrit.*, 1953 *a*, **51**, p. 241 ; 1953 *b*, **51**, p. 623.
SAVERBORN, DANIELSSON et SVEDBERG. — *Svensk. Kem. Tid.*, 1944, **56**, p. 75.
SCALLET. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1947, **69**, p. 1602.
SCHJERNING. — *C. R. Trav. Lab. Carlsberg., Ser. Chim.*, 1914, **11**, p. 45.
SCHORMULLER, STORIG et LEICHTER. — *Zeits. Lebens. unt. Forsch. Dtsch.*, 1953, **96**, p. 1.
SCHULLERUD. — *Das Roggenmehl. Moritz Shapper*. Leipzig, 1939.
SCHULTZ et THOMAS. — *Cereal Chem.*, 1949, **26**, p. 60.
SCHWARZE. — *Z. Pflanz. Zücht. Dtsch.*, 1950, **30**, p. 300.
SCHWEIGERT. — *J. Nutrit.*, 1947, **33**, p. 553. — *Poultry Sc.*, 1948, **27**, p. 223.
SCHWERT, PUTNAM et BRIGGS. — *Arch. Biochem.*, 1944, **4**, p. 371.
SCRIBAN. — *Ind. Agr. Alim.*, 1949, n°3-4, p. 133. — Les protides de l'orge, du malt et du moût. Thèse. Lille, Morel et Corduant éd., 1951.
SECCHI. — *Quaderni. Nutriz.*, 1942, **8**, p. 363.
SEGAL. — *J. S. Afr. Chem. Inst.*, 1933, **16**, p. 41.

SHARP et GORTNER. — *Min. Agr. Exp. Sta. Techn. Bull.*, 1923, **19**.
SHARP et HERRINGTON. — *Cereal Chem.*, 1927, **4**, p. 249.
SHOWALTER et CARR. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1922, **44**, p. 2019.
SHUTT. — *J. S. C. J.*, 1909, **28**, p. 236.
SINCLAIR et GORTNER. — *Cereal Chem.*, 1933, **10**, p. 171.
SINCLAIR et MacCALLA. — *Canad. J. Res.*, 1937, *C* **15**, p. 187.
SMITH et GEDDES. — *Cereal Chem.*, 1942, **19**, p. 785.
SMITH, GREEN et BARTNER. — *J. Biol. Chem.*, 1946, **164**, p. 159.
SNYDER. — *Min. Agr. Exp. Sta. Bull.*, 1899, **63**, p. 519. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1905, **27**, p. 1068. — *U. S. Dept. Agr. Bur. Chem. Bull.*, 1907, **105**, p. 88.
SPENCER et MacCALLA. — *Canad. J. Res.*, 1938, **16**, p. 483.
SPITZER, CARR et EPPLE. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1919, **41**, p. 1212.
SPORER et KAPFHANMER. — *Z. Physiol. Chem.*, 1930, **187**, p. 84.
SREENIVASAN. — *Cereal Chem.*, 1942, **19**, p. 36.
SREENIVASAN et SADASIVAN. — *Cereal Chem.*, 1942, **19**, p. 47.
STAKER et GORTNER. — *J. Phys. Chem.*, 1931, **35**, p. 1565.
STARE et HEGSTED. — *Feder. Proc.*, 1944, **3**, p. 120.
STERN. — *Cereal Chem.*, 1944, **21**, p. 81 ; 1948, **25**, p. 220.
STEWART, HENSLEY et PETERS. — *J. Nutrit.*, 1943, **26**, p. 519.
STOCKELBACH et BAILEY. — *Cereal Chem.*, 1938, **15**, p. 801.
STOKES, GUNNESS, DWYER et CASWELL. — *J. Biol. Chem.*, 1945, **160**, p. 35.
STUART et HARRIS. — *Cereal Chem.*, 1942, **19**, p. 288.
SULLIVAN. — *Cereal Chem.*, 1948, **25**, nº 6, supp.
SULLIVAN et HESS. — *Publ. Health Rep.* USPHS, 1930 supp. 86, p. 1.
SULLIVAN et HOWE. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1937, **59**, p. 2472.
SULLIVAN, NEAR et FOLEY. — *Cereal Chem.*, 1936, **13**, p. 318.
SULLIVAN et PAYNE. — *Cereal Chem.*, 1951, **28**, p. 340.
SULLIVAN, SCHMALZ et ASTLEFORD. — *Cereal Chem.*, 1940, **17**, p. 507.
SURE. — *Arch. Pediatr.*, 1952, **69**, p. 359.
SURE. — *J. Nutrit.*, 1953 *a*, **50**, p. 235.
SURE. — *J. Agric. Food Chem.*, 1953 *b*, **1**, p. 626.
SURE, EASTERLING, DOWELL et CRUDUP. — *J. Sc. Food. Agr.*, 1953, **1**, p. 1207.
SUTTER. — La protection Alimentaire des écoliers. Paris. Librairie Médicis, édit., 1945.
SUZUKI, YOSHIMURA et FUGI. — *J. Coll. Agr. Imp. Univ.*, Tokyo, 1909, **1**, p. 77.
SWALLEN. — *Ind. Eng. Chem.*, 1941, **33**, p. 394.
SWAMINATHAN. — *J. Méd. Res.*, 1937, **24**, p. 767 et **25**, p. 57.
SZILVINYI et KILLIAN. — *Mitt. Versuch. Garungs.*, 1953, **7**, p. 142.
SZILVINYI et LAMPL. — *Mitt. Versuch. Garungs.*, 1953, **7**, p. 146.
TADOKORO, ITO et WATANABE. — *J. Coll. Agr. Hokkaido*, Imp. Univ., 1926, **18**, p. 175.
TADOKORO, NAKAMURA et WATANABE. — *J. Coll. Agr. Hokkaido*, Imp. Univ., 1925, **14**, p. 129.
TADOKORO, NAKAMURA et WATANABE. — *J. Coll. Agr. Hokkaido*, Imp. Univ., 1926, **16**, p. 73.
TADOKORO et WATANABE. — *J. Coll. Agr. Hokkaido.*, Imp. Univ., 1928, **25**, p. 133.
TAGUE. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1925 *a*, **47**, p. 418. — *Cereal Chem.*, 1925 *b*, **2**, p. 117.
TAKAHASHI et SATO. — *J. Coll. Agr.*, Imp. Univ., Tokyo, 1913, **5**, p. 135.
TAKAHASHI et SHIRAHAMA. — *J. Coll. Agr. Hokkaido*, Imp. Univ., 1931-32, **30**, p. 119.
TARANOVA. — *Biokhimija.* SSSR, 1951, **16**, p. 239.
TEAS, CAMERON et NEWTON. — *Agron. J.*, 1952, **44**, p. 434.
TELLER. — *Ark. Agr. Exp. Sta. Bull.*, 1896, **42**, p. 85 ; 1898, **53**, p. 63.

TELLER et TELLER. — *Cereal Chem.*, 1932, **9**, p. 560.
TENG-WU. — *Chim. J. Sci. Agr.*, 1944, **1**, p. 173.
TERNUCHI et OKABE. — *Chem. Abstr.*, 1928, **22**, p. 2959. — *J. Biochem.*, Japan, 1929, **8**, p. 459.
TERROINE. — Le métabolisme de l'azote. Presses Universitaires, Ed. Paris, 1933.
TERROINE et VALA. — *Bull. Soc. Sc. Hyg. Alim.*, 1933, **21**, p. 105.
THATCHER. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1907, **29**, p. 910.
THOMPSON. — *Amer. Miller*, 1926, **54**, p. 396.
THOMPSON et STEWART. — *J. Exp. Bot.*, 1952, **3**, p. 170.
TILLMANS et ALT. — *Biochem. Z.*, 1925, **164**, p. 135.
TILLMANS, HIRSCH et STOPPEL. — *Biochem. Z.*, 1928, **198**, p. 379.
TISDALL, DRAKE et BROWN. — *Amer. J. Dischild*, 1930, **40**, p. 791.
TOWN. — *Biochem. J.*, 1941, **35**, p. 417.
TRAUB. — *Un. Intern. Cristallog. 3e Congrès Intern.*, Paris ; Copenhagen. F. Bagges éd., 1954, 43 p.
TRENTON. — US Patent, 1947.
TRISTRAM. — *Biochem. J.*, 1939, **33**, p. 1271. — *Adv. in Prot. Chem.*, 1949, **5**, p. 83.
UDY. — *Cereal Chem.*, 1953, **30**, p. 288 ; 1954, **31**, p. 389.
UPSON et CALVIN. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1915, **37**, p. 1295. — *Nebr. Agr. Expt. Sta. Res. Bull.*, 1916, nº 8.
URICN et GOLOVTSCHENKO. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1940, **22**, p. 203.
URION et LEJEUNE. — *Brasseur Franç.*, 1940, **22**, p. 214.
URION, LEJEUNE et COLLIN. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1944, **26**, p. 310.
URION, LEJEUNE, FRONSACQ et COLLIN. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1951, **33**, p. 120.
URION, LEJEUNE et GOLOVTSCHENKO. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1944, **26**, p. 221 et 303.
URION, LEJEUNE et THIEC. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1944, **26**, p. 316.
URION et RAUX. — *Brasseur Franç.*, 1939, **1**, p. 393.
VAN SLYKE. — *J. Biol. Chem.*, 1911, **10**, p. 15.
VASSEL, STEPHENS et HOWARD. — *Cereal Chem.*, 1949, **26**, p. 182.
VAY (de). — *Cereal Chem.*, 1952, **29**, p. 309.
VERCOUTEREN et LONTIE. — *Arch. Intern. Physiol.*, 1954, **62**, p. 579.
VICKERY et WINTERNITZ. — *J. Biol. Chem.*, 1944, **156**, p. 211.
VICKERY. — *C. R. Trav. Lab. Carlsberg, Ser. Chim.*, 1938, **22**, p. 519. — *Feder. Proc.*, 1944, **3**, p. 110.
VIDAL. — *Ann. Soc. Cient. Argent.*, 1950, **101**, p. 173.
VIRTANEM et HAMBERG. — *Acta Chem. Scand.*, 1947, **1**, p. 847.
VIRTANEM, LAINE et TOIVONEM. — *Z. Physiol. Chem.*, 1940, **266**, p. 193.
VITRAC. — *Journ. Scient. du Pain*, Paris, 1948, p. 49.
VORHEES. — *New Jersey Expt. Sta. Bull.*, 1894, **105**.
VUATAZ. — *Helv. Chim. Acta*, 1950, **33**, p. 433.
WALLIS. — *8e Cong. Intern. Ind. Agric.*, Bruxelles, 1950, **1**, p. 535. — *J. Inst. Brewing.*, 1951, **57**, p. 86.
WALSH. — *Ind. Eng. Chem.*, 1937, **29**, p. 673.
WATSON, ARRHENIUS et WILLIAMS. — *Nature*, 1936, **137**, p. 322.
WHITSON, WELLS et VIVIAN. — *Wisc. Agr. Expt. Sta.*, 1902, p. 192.
WIAZONNICKA. — *Bull. Ac. Polon. Sc. Let.* (B), 1933, p. 107.
WIDSTOE. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1903, **25**, p. 1234.
WINDSOR. — *J. Biol. Chem.*, 1951, **192**, p. 595.
WINTON, BURNETT et BORNMANN. — *U.S. Dept. Agr. Farm. Bull.*, 1915, p. 298.
WINTON et WINTON. — *Struct. Camp. Foods.* VIII, 1937, Wiley N. Y. éd.
WOHLBIER et WEBER. — *Forsch. Sonderneft.*, 1940, **12**, p. 132.
WOHRER. — *Brass. Malt. Belge*, 1953, **3**, p. 123.
WOOD. — *Proc. Camb. Phil. Soc.*, 1906-8, **14**, p. 115. — *J. Agr. Sc.*, 1907, **2**, p. 139 et 267.

WOOD et HARDY. — *Proc. Roy. Soc. B.*, 1908, **81**, p. 38.
WOODMAN. — *J. Agr. Sci.*, 1922, **12**, p. 231.
WOODS. — *U. S. Dept. Agr. Farm. Bull.*, 1907, p. 298.
WOOLEY et SCHRELL. — *J. Biol. Chem.*, 1945, **157**, p. 151.
WOSTMANN. — *Cereal Chem.*, 1950, **27**, p. 391.
YEMM et FOLKES. — *Biochem. J.*, 1953, **55**, p. 700.
ZAMBOTTI. — *Quaderni Nutriz.*, 1940, **7**, p. 126.
ZELENY. — *Cereal Chem.*, 1935, **12**, p. 536 ; 1941, **18**, p. 86 ; 1947, **24**, p. 465.
ZELENY et COLEMAN. — *U.S. Dept. Agr. Techn. Bull.*, 1939, p. 24.
ZELENY, NEUSTADT et DIXON. — *Cereal Chem.*, 1942, **19**, p. 1.
ZINN. — *J. Agr. Res.*, 1923, **23**, p. 529.
ZIEGLER. — *Cereal Chem.*, 1940, **17**, p. 460.
ZITTLE et ELDRED. — *J. Biol. Chem.*, 1944, **156**, p. 401.
ZWEIFEL. — *Rev. Romande Agric. Vit. Arbor.*, 1946, **2**, p. 40.

Nous tenons à remercier ici très vivement M. le Directeur de l'École Française de Meunerie ainsi que M. le Professeur BURÉ de l'aide qu'ils nous ont apportée dans la réalisation de ce travail en mettant obligeamment à notre disposition le service de documentation de l'École.

Le Directeur-Gérant : B. LACLAVIÈRE.

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 15-3-1956

Dépôt légal: 1er trimestre 1956 *N° d'impression: 194*

ALCOOL ÉTHYLIQUE ET MÉTABOLISME AZOTÉ

I. — INFLUENCE DE L'ALCOOL DILUÉ ET D'UN VIN NATUREL SUR LA VALEUR DE LA PERTE AZOTÉE ENDOGÈNE CHEZ LE RAT

PAR

Michel FLANZY, Denise HUGOT et Jean CAUSERET

Station centrale de Recherches sur l'Œnologie, la Cidrerie et les Jus de Fruits, Narbonne
Laboratoire de Physiologie de la Nutrition, Paris.

PLAN DU MÉMOIRE

I. — **Introduction.**

II. — **Action de l'alcool et d'un vin naturel sur la valeur de la perte azotée endogène.**
1. Techniques expérimentales.
2. Résultats.

III. — **Discussion.**
1. Critique des résultats précédents.
2. Nouvelle expérimentation.

IV. — **Conclusions.**

Bibliographie.

I. — INTRODUCTION

Bien que de nombreux expérimentateurs aient étudié les effets de l'alcool éthylique sur le métabolisme de l'azote, il ne paraît guère possible de tirer de leurs recherches une conclusion sûre, en raison des divergences des résultats qu'ils ont obtenus.

1° Pour certains, l'alcool se comporterait comme un *aliment d'épargne pour les protides*. Ainsi, chez diverses espèces animales ou chez l'homme, MUNK (8), OFFER (10), ROSENFELD (13), NEUMANN (9), CLOPATT (3) et PRINGSHEIM (11) signalent que l'adjonction d'alcool à un régime alimentaire, inchangé par ailleurs, améliore le bilan azoté de l'organisme.

Nous ne nous étendrons pas sur les résultats de ces expérimentateurs, dont la critique a été faite en 1929 par TERROINE et BONNET (15) dans

une étude d'ensemble sur la valeur alimentaire de l'alcool. Nous nous contenterons de faire remarquer que, dans toutes ces expériences, l'administration d'alcool entraînait une augmentation appréciable de la valeur énergétique du régime. Or, lorsque cette valeur est insuffisante, l'organisme peut se trouver dans l'obligation de faire appel à ses protides tissulaires pour couvrir ses besoins caloriques, du moins dans le cas où il ne dispose plus de réserves grasses (14) : il n'y a donc pas lieu de s'étonner que la consommation d'alcool, substance qui peut couvrir en partie les besoins énergétiques de l'organisme (1), évite à ce dernier une telle nécessité et améliore en conséquence son bilan azoté.

Les résultats obtenus par ROSENFELD paraissent confirmer ce raisonnement. Chez un homme soumis à un régime alimentaire de faible valeur énergétique, qui entraîne un bilan azoté *négatif*, ROSENFELD constate que l'administration d'alcool, sans autre changement du mode d'alimentation, suffit à assurer un bilan *positif*. Mais il signale que l'adjonction de saccharose au régime a le même effet :

Complément alimentaire		Valeur énergétique du complément (2)	Bilan azoté
—		—	—
g		cal	g
Néant		0	— 0,677
Alcool	60	420	+ 0,406
Alcool	120	840	+ 1,538
Saccharose ..	155	620	+ 1,111

Il est frappant de constater l'amélioration régulière du bilan azoté lorsque la valeur énergétique de la ration s'accroît, que son accroissement soit dû à l'introduction de l'alcool ou à celle du saccharose.

2° D'autres auteurs nient l'existence d'un effet d'épargne de l'alcool pour les protides.

Ainsi, MIURA (6) réalise chez un sujet une expérience en 4 périodes :

1. Régime normal, assurant un bilan azoté légèrement positif ;

2. Même régime, dans lequel on substitue 65 g d'alcool à une quantité isodyname de glucides ;

3. De nouveau, régime normal ;

4. Même régime, dans lequel on supprime la même proportion de glucides qu'au cours de la 2e période, sans y substituer une quantité isodyname d'alcool.

Le passage de la 1re à la 2e période entraîne un bilan azoté fortement négatif ; au cours de la 3e période, le bilan reprend la valeur légèrement positive qu'il avait avant l'administration d'alcool ; enfin, au cours de la 4e période, il redevient fortement négatif, comme au cours de la 2e pé-

(1) L'oxydation de l'alcool dans l'organisme fournit 7 calories au gramme. Si ces calories ne sont pas utilisables pour le travail musculaire, elles sont utilisables pour la couverture des dépenses internes d'énergie, qu'elles semblent pouvoir satisfaire dans une proportion comprise entre 50 et 80 p. 100 chez l'adulte. L'alcool apparaît donc capable d'épargner 800 à 1000 calories glucidiques, lipidiques ou protidiques.

(2) Les valeurs citées dans cette colonne ont été calculées par nous.

riode. MIURA en conclut que l'effet d'épargne de l'alcool pour les protides est nul, puisque son adjonction à une ration de valeur énergétique insuffisante — celle de la 4e période —n'améliore pas un bilan azoté très défavorable.

Mais sur le plan pratique, ne peut-on craindre que la consommation par l'homme d'une quantité appréciable d'alcool, qui risque de se substituer à celle d'une quantité isodyname de glucides, de lipides ou de protides, ne se traduise en définitive par un abaissement de la quantité d'azote qui se fixe dans l'organisme, voire par un bilan azoté négatif ?

L'expérience de MIURA a été reprise ultérieurement par MOGILIANSKY (7) et par ROSEMAN (12). Leurs constatations sont moins défavorables : les résultats qu'ils obtiennent au cours de la 2e période sont en effet moins bons qu'au cours de la 1re, mais bien meilleurs qu'au cours de la 4e (1).

Enfin, plus récemment, MÈLKA a repris l'étude du problème par la technique suivante : 14 heures environ après l'ingestion du dernier repas pauvre en protéines, il administre à des hommes adultes une grande quantité d'eau pure ou additionnée de 0,5 g d'alcool par kg de poids corporel. Il constate :

— que, dans les 3 heures qui suivent leur administration, l'eau pure et l'eau additionnée d'alcool entraînent une augmentation pratiquement égale de l'élimination azotée urinaire ;

— que l'augmentation de la quantité d'urée éliminée va de pair avec l'augmentation de la diurèse ;

— que la teneur du sérum sanguin en azote non protéique s'abaisse sensiblement au cours de l'expérience.

Par ailleurs, lorsqu'il administre aux sujets d'expérience des solutions concentrées d'alcool, MÈLKA n'observe pas d'accroissement de l'élimination azotée urinaire s'il n'y a pas augmentation de la diurèse.

De ces résultats, il conclut que l'administration de liquides alcooliques peut augmenter la valeur de l'élimination azotée urinaire, mais que cette augmentation s'explique uniquement par un lavage de l'urée préexistante du sang et des tissus, qui n'a rien de commun avec une accélération du catabolisme azoté et dans lequel l'alcool n'a pas de responsabilité propre.

Sans doute, les divergences des expérimentateurs dont nous avons rapporté les observations peuvent-elles résulter de la variété même des conditions expérimentales dans lesquelles ils se sont placés, variété qui rend difficile la comparaison de leurs résultats.

(1) ATWATER et BENEDICT (1) ont également repris les recherches de MIURA. Mais l'interprétation de leurs résultats est difficile car leurs expériences ne comportent que les deux premières périodes du schéma indiqué plus haut. Ils ont constaté que la substitution d'alcool à une fraction des glucides de la ration, exerçait un effet nettement défavorable sur le bilan azoté.

Ainsi que l'a fait remarquer MÈLKA, il n'en est pas moins vrai que l'existence d'un effet direct de l'alcool sur la dégradation des protides du bioplasme est regardée assez généralement comme un fait acquis : elle est mentionnée en particulier dans un grand nombre de manuels de physiologie ou de pharmacologie.

Il nous a semblé utile de reprendre l'étude du problème, non pas pour ajouter un nouveau travail à tous ceux qui ont déjà été effectués, mais pour déterminer l'influence de certains facteurs sur les résultats obtenus. Deux de ces facteurs méritent tout particulièrement de retenir l'attention :

— la teneur en azote du régime alimentaire,

— le degré d'accoutumance à l'ingestion d'alcool.

Dans ce premier travail, nous avons étudié l'effet de l'alcool dilué et d'un vin naturel sur l'élimination azotée *endogène*, les sujets d'expérience étant soumis à un régime alimentaire à peu près dépourvu d'azote. Nous avons l'intention de reprendre ultérieurement l'étude du même problème chez des sujets soumis à un régime normal.

D'autre part, l'évolution de l'excrétion azotée a été suivie dans le temps, afin de tenir compte de l'apparition éventuelle de phénomènes d'accoutumance.

II. — ACTION DE L'ALCOOL ET D'UN VIN NATUREL SUR LA VALEUR DE LA PERTE AZOTÉE ENDOGÈNE

1° Techniques expérimentales

L'expérience a porté sur 27 rats blancs adultes du sexe mâle ; leur poids était compris initialement entre 200 et 300 g. Ces rats ont été soumis durant 28 jours à un régime ternaire, obtenu par cuisson de deux parties du mélange suivant avec une partie d'eau distillée :

Amidon de froment	50
Saccharose	32
Huile d'arachide	12
Mélange salin de Hubbel et coll.	4
Agar-agar	2

Les vitamines hydrosolubles ont été introduites dans le régime aux doses suivantes (par kg) : thiamine, 2 mg ; riboflavine, 3 mg ; pyridoxine, 2,5 mg ; acide nicotinique, 50 mg ; pantothénate de calcium, 10 mg ; vitamine K hydrosoluble, 1 mg. Les vitamines liposolubles ont été incorporées à l'huile d'arachide, sous forme de 1 p. 100 d'huile de foie de morue [1].

Le régime ternaire contenait des traces d'azote : 40 mg p. 100 g.

Les animaux ont reçu comme boisson de l'eau distillée.

[1] Titrant 2.000 U. I. de vitamine A et 500 U. I. de vitamine D par centimètre cube.

Durant 3 jours, les animaux se sont tout d'abord habitués à leur nouveau régime. La phase expérimentale proprement dite a duré 25 jours ; les 27 sujets ont été répartis en 4 lots de 7 ou 8 chacun, l'administration des boissons à comparer ne commençant qu'au 6e jour de cette phase. Ces lots étaient les suivants :

— lot I : animaux témoins,

— lot II : animaux recevant de l'eau distillée,

— lot III : animaux recevant une dilution d'alcool à 10°,

— lot IV : animaux recevant un vin rouge naturel ajusté à 10° d'alcool par addition d'eau distillée.

L'administration d'eau aux sujets du lot I était destinée à voir, par comparaison entre les résultats obtenus dans les lots I et II, si les boissons alcooliques étudiées exerçaient un « effet de lavage » sur l'azote de l'organisme. La dilution alcoolique a été préparée à partir d'alcool rectifié extra-neutre. Quant au vin utilisé, c'était un vin rouge de Treilles (Aude) de la récolte 1952, de macération totale, titrant 10°5.

L'eau, la dilution alcoolique et le vin ont été administrés par intubation gastrique à la dose quotidienne de 6 ml p. 100 g de poids (2 intubations de 3 ml). On trouvera une description de la technique d'intubation dans une autre publication (4).

La phase expérimentale a été divisée en 5 périodes de 5 jours chacune: au cours de ces 5 périodes, la quantité de nourriture consommée a été mesurée et les excreta (fèces et urines) recueillis au moyen d'un dispositif décrit dans une autre publication (2). Les quantités d'azote ingérées et éliminées par voie intestinale ou rénale ont été évaluées par analyse des régimes, des fèces et des urines (microkjeldahl).

2° Résultats

Les résultats obtenus sont groupés dans les *tableaux I à IV*. Les balances azotées mentionnées dans ces tableaux ont été calculées par différence entre l'azote ingéré et l'azote total excrété.

L'examen de ces tableaux conduit aux conclusions suivantes :

1° L'administration de la dilution alcoolique ou du vin n'a pas modifié sensiblement l'élimination intestinale d'azote.

2° Au contraire, l'administration de l'une ou de l'autre de ces deux boissons a provoqué une élévation transitoire de l'excrétion d'azote par le rein : au cours de la 2e période métabolique, les animaux des lots III et IV ont perdu, par cette voie, plus d'azote qu'au cours de la 1re période.

3° Chez les témoins (lot I), l'excrétion azotée s'abaisse régulièrement de la 2e à la 4e période ; chez ceux qui reçoivent de l'eau par intubation (lot II), elle décroît aussi, mais de manière plus lente.

4° La balance azotée est affectée de la même manière que l'excrétion urinaire : chez les rats qui reçoivent de l'alcool dilué ou du vin, elle est

d'abord modifiée dans un sens défavorable, puis reprend une valeur normale. Les rats qui reçoivent de l'eau ont un comportement intermédiaire entre celui des rats qui reçoivent de l'alcool et celui des témoins.

Il semble que, dans notre expérience, l'effet essentiel de l'alcool dilué ou du vin consiste dans une « décharge azotée » urinaire qui retentit sur la balance azotée, mais qui dure peu de temps. Du point de vue qui nous occupe, l'accoutumance de l'organisme à l'alcool ou au vin apparaît très rapide. Ce fait ressort clairement de la *figure I*.

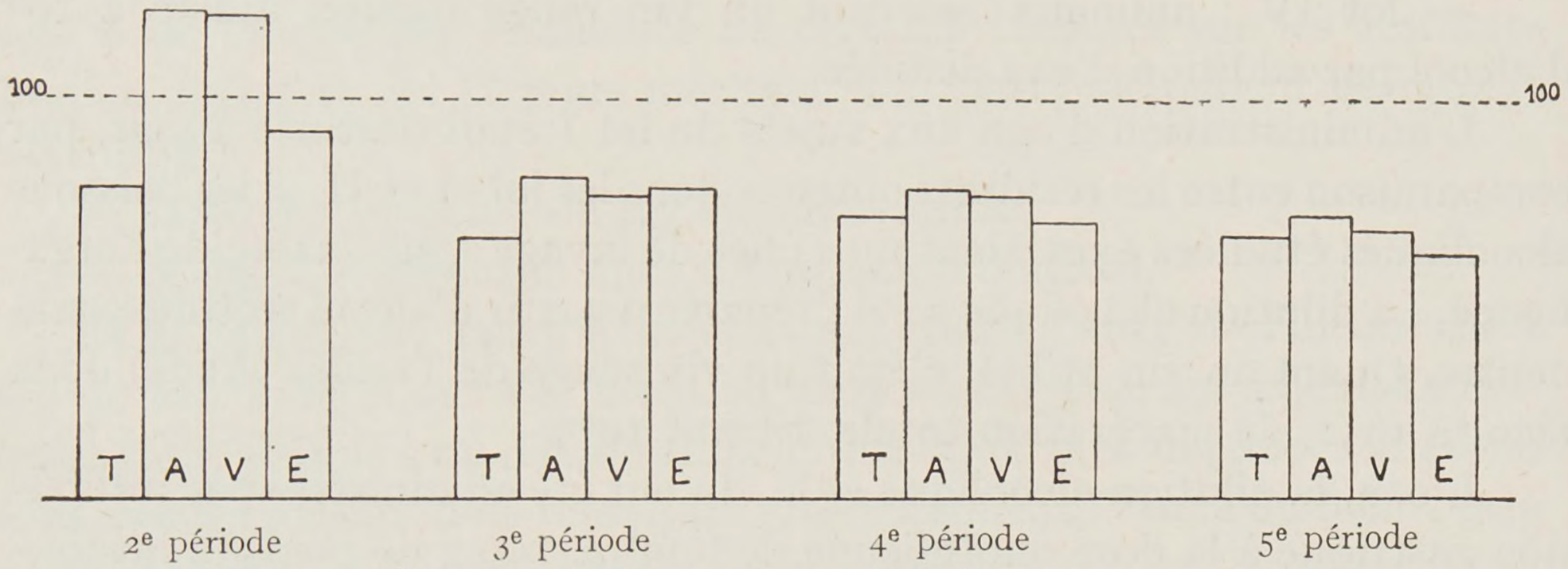


FIG. 1. — Évolution de l'élimination azotée urinaire au cours du temps.
T = Témoins, A = Alcool, V = Vin, E = Eau,
L'élimination azotée urinaire de la première période (sans administration de boissons) a été posée conventionnellement égale à 100 pour chacun des quatre lots.

TABLEAU I

Balance azotée de rats en inanition azotée : animaux témoins (lot I)

Périodes expérimentales	Rats	N ingéré	N fécal	N urinaire	N excrété total	Balance azotée
		mg par jour	mg par jour	mg par jour	mg par jour	mg par jour
1er-5e jours.....	1	4,94	18,16	48,83	66,99	− 62,05
	2	4,22	17,94	43,23	61,17	− 56,95
	3	4,69	12,53	35,08	47,61	− 42,92
	4	4,07	12,50	46,90	59,40	− 55,33
	Moyennes			*43,51 ± 3,04*		*−54,31 ± 4,98*
6e-10e jours	1	6,10	20,09	41,66	61,75	− 55,65
	2	5,00	14,74	30,94	45,67	− 40,67
	3	4,19	12,51	26,52	39,03	− 34,84
	4	5,11	14,82	37,69	52,51	− 47,40
	Moyennes			*34,20 ± 3,38*		*−44,64 ± 4,48*
11e-15e jours	1	4,59	16,42	38,78	55,20	− 50,61
	2	4,53	15,77	19,74	35,51	− 30,98
	3	4,49	14,03	22,40	36,43	− 31,94
	4	4,55	12,36	34,16	46,52	− 41,97
	Moyennes			*28,77 ± 3,66*		*−38,87 ± 4,63*
16e-20e jours	1	4,35	14,70	36,34	51,04	− 46,69
	2	4,18	16,17	24,98	41,15	− 36,97
	3	3,65	11,44	35,78	47,22	− 43,57
	4	4,98	16,77	28,22	44,99	− 40,01
	Moyennes			*31,33 ± 2,81*		*−41,81 ± 2,11*
21e-25e jours	1	5,02	13,68	39,03	52,71	− 47,69
	2	4,10	12,13	22,34	34,47	− 30,37
	3	3,59	10,48	22,79	33,27	− 29,68
	4	4,89	16,00	31,58	47,58	− 42,69
	Moyennes			*28,93 ± 3,98*		*−37,60 ± 3,56*

TABLEAU II

Balance azotée de rats en inanition azotée : animaux recevant de l'eau (lot II)

Périodes expérimentales	Rats	N ingéré	N fécal	N urinaire	N excrété total	Balance azotée
		mg par jour	mg par jour	mg par jour	mg par jour	mg par jour
1er-5e jours (sans eau)	5	5,34	20,34	58,60	78,94	− 73,60
	6	4,94	16,17	34,41	50,58	− 45,64
	7	5,23	18,50	49,08	67,58	− 62,35
	8	4,36	18,75	50,12	68,87	− 64,51
	9	4,97	14,75	35,87	50,62	− 45,65
	10	5,22	14,96	51,66	66,62	− 61,40
	11	4,24	18,54	42,00	60,54	− 56,30
	Moyennes			*45,96 ± 3,35*		*−58,49 ± 3,85*
6e-10e jours (avec eau)	5	6,24	20,98	49,78	70,76	− 64,52
	6	5,48	15,11	33,26	48,37	− 42,89
	7	5,65	18,89	48,22	67,11	− 61,46
	8	4,46	13,36	41,89	55,25	− 50,79
	9	4,67	15,02	32,87	47,89	− 43,22
	10	6,67	19,21	35,54	54,55	− 47,88
	11	3,72	20,05	53,76	73,81	− 70,09
	Moyennes			*42,19 ± 3,23*		*−54,41 ± 4,11*
11e-15e jours (avec eau)	5	6,05	19,11	39,76	58,87	− 52,82
	6	5,06	15,31	34,36	49,67	− 44,61
	7	5,62	17,99	39,48	57,47	− 51,85
	8	4,38	14,38	34,16	48,54	− 44,16
	9	4,49	5,01	32,00	37,01	− 32,52
	10	4,70	16,15	38,64	54,79	− 50,09
	11	4,70	17,07	36,12	53,19	− 48,49
	Moyennes			*36,36 ± 1,14*		*−46,36 ± 2,63*
16e-20e jours (avec eau)	5	5,96	16,98	36,90	53,88	− 47,92
	6	4,99	13,54	30,04	43,58	− 38,59
	7	5,33	17,31	35,67	52,98	− 47,65
	8	4,39	15,14	28,84	43,98	− 39,59
	9	4,22	11,54	28,70	40,24	− 36,02
	10	4,48	13,75	32,65	46,40	− 41,92
	11	4,23	15,54	31,92	47,46	− 43,23
	Moyennes			*32,10 ± 1,22*		*−42,13 ± 1,70*
21e-25e jours (avec eau)	5	5,38	14,05	34,14	48,19	− 42,81
	6	4,44	12,13	28,93	41,06	− 36,62
	7	5,39	14,16	31,06	45,22	− 39,83
	8	4,23	14,25	23,90	38,15	− 33,92
	9	3,79	11,73	26,02	37,75	− 33,96
	10	4,39	13,96	27,59	41,55	− 37,16
	11	3,88	13,17	28,26	41,43	− 37,55
	Moyennes			*28,56 ± 1,36*		*−37,41 ± 1,19*

Tableau III

Balance azotée de rats en inanition azotée : animaux recevant de l'alcool (lot III)

Périodes expérimentales	Rats	N ingéré	N fécal	N urinaire	N excrété total	Balance azotée
		mg par jour	mg par jour	mg par jour	mg par jour	mg par jour
1er-5e jours (sans alcool)	12	5,19	14,53	54,04	68,57	− 63,38
	13	6,50	17,60	46,03	63,63	− 57,13
	14	4,91	17,11	38,78	55,89	− 50,98
	15	5,04	18,49	48,86	67,35	− 62,31
	16	4,78	14,66	34,55	49,21	− 44,43
	17	5,16	14,68	45,53	60,01	− 54,85
	18	4,72	14,78	35,36	50,14	− 45,42
	19	5,06	15,40	50,90	66,30	− 61,24
	Moyennes			*44,23 ± 2,56*		*−54,97 ± 2,63*
6e-10e jours (avec alcool)	12	4,41	13,76	59,86	73,72	− 69,31
	13	4,41	17,04	51,18	68,22	− 63,81
	14	5,35	16,31	35,92	52,23	− 46,88
	15	3,21	13,08	53,62	66,70	− 63,49
	16	2,76	11,39	35,52	46,91	− 44,15
	17	2,56	11,50	63,87	75,37	− 72,81
	18	1,42	6,18	83,38	89,56	− 88,14
	19	3,32	17,06	51,44	68,50	− 65,18
	Moyennes			*54,35 ± 5,47*		*−64,22 ± 4,96*
11e-15e jours (avec alcool)	12	5,37	15,49	46,70	62,19	− 56,82
	13	5,50	16,76	40,88	57,64	− 52,14
	14	4,88	13,33	33,04	46,37	− 41,49
	15	4,05	13,94	40,66	54,60	− 50,55
	16	3,95	11,25	28,53	39,78	− 35,83
	17	4,09	15,68	34,41	50,09	− 46,00
	18	4,10	12,45	25,14	37,59	− 33,49
	19	2,98	12,16	39,28	51,44	− 48,46
	Moyennes			*36,08 ± 2,52*		*−45,60 ± 2,87*
16e-20e jours (avec alcool)	12	5,18	13,51	43,60	57,11	− 51,93
	13	4,36	14,14	41,19	55,33	− 50,97
	14	3,82	13,68	36,96	50,64	− 46,82
	15	3,87	13,83	33,74	47,57	− 43,70
	16	3,74	13,66	26,71	40,37	− 36,63
	17	3,89	11,95	34,38	46,33	− 42,44
	18	3,52	8,13	22,85	30,98	− 27,46
	19	3,21	10,73	41,10	51,83	− 48,62
	Moyennes			*35,07 ± 2,57*		*−43,57 ± 2,90*
21e-25e jours (avec alcool)	12	3,83	15,40	34,10	49,50	− 45,67
	13	4,49	14,52	37,41	51,93	− 47,44
	14	4,41	14,08	23,74	37,82	− 33,41
	15	3,67	13,30	34,10	47,40	− 43,73
	16	3,37	9,95	32,09	42,04	− 38,67
	17	3,09	12,04	37,35	49,39	− 46,30
	18	3,12	11,28	21,13	32,41	− 29,29
	19	3,00	12,60	36,80	49,40	− 46,40
	Moyennes			*32,09 ± 2,22*		*−41,36 ± 2,42*

TABLEAU IV

Balance azotée de rats en inanition azotée : animaux recevant du vin (lot IV)

Périodes expérimentales	Rats	N ingéré	N fécal	N urinaire	N excrété total	Balance azotée
		mg par jour	mg par jour	mg par jour	mg par jour	mg par jour
1er-5e jours (sans vin)	20	6,58	20,42	51,35	71,77	− 65,29
	21	5,06	19,88	45,95	65,83	− 60,77
	22	4,62	13,98	37,35	51,33	− 46,71
	23	4,67	17,80	43,76	61,56	− 56,89
	24	5,09	14,64	36,79	51,43	− 46,34
	25	5,75	16,52	44,86	61,38	− 55,63
	26	4,96	17,36	27,36	44,72	− 39,76
	27	4,31	22,05	70,98	93,03	− 88,72
	Moyennes			*44,92 ± 4,55*		*−57,51 ± 5,42*
6e-10e jours (avec vin)	20	3,06	19,34	58,34	77,68	− 74,62
	21	2,61	15,57	48,80	64,37	− 61,76
	22	3,43	14,33	40,04	54,37	− 50,94
	23	2,93	14,62	50,82	65,44	− 62,51
	24	3,41	14,01	46,28	60,29	− 56,88
	25	1,28	12,18	72,88	85,06	− 83,78
	26	3,03	15,77	45,72	61,49	− 58,46
	27	3,54	29,55	70,56	100,11	− 96,57
	Moyennes			*54,18 ± 4,24*		*−68,19 ± 5,48*
11e-15e jours (avec vin)	20	4,05	22,12	39,06	61,18	− 57,13
	21	4,17	16,80	30,77	47,57	− 43,40
	22	3,23	14,96	26,68	41,64	− 38,41
	23	4,00	17,35	36,60	47,95	− 43,95
	24	3,59	16,50	27,52	44,02	− 40,43
	25	4,40	19,16	34,41	53,57	− 49,17
	26	3,47	17,46	28,78	46,24	− 42,77
	27	3,58	21,62	60,42	82,04	− 78,46
	Moyennes			*35,53 ± 3,88*		*−49,22 ± 4,66*
16e-20e jours (avec vin)	20	4,75	22,22	40,12	62,34	− 57,59
	21	5,10	16,18	28,50	44,68	− 39,58
	22	3,93	14,17	30,18	44,35	− 40,42
	23	3,93	15,02	36,51	51,53	− 47,60
	24	3,69	14,48	29,54	44,02	− 40,33
	25	4,18	14,00	32,14	46,14	− 41,96
	26	3,29	16,28	29,68	45,96	− 42,67
	27	3,51	17,15	50,82	67,97	− 64,46
	Moyennes			*34,69 ± 2,70*		*−46,83 ± 3,29*
21e-25e jours (avec vin)	20	3,39	18,29	31,42	49,71	− 46,32
	21	3,68	19,20	31,74	50,94	− 47,26
	22	3,82	16,03	27,99	44,02	− 40,20
	23	4,40	16,70	32,97	49,67	− 45,27
	24	4,04	13,78	25,31	39,09	− 35,05
	25	4,01	15,01	29,06	44,07	− 40,06
	26	3,66	16,45	25,09	41,54	− 37,88
	27	3,40	12,98	41,38	54,36	− 50,96
	Moyennes			*30,49 ± 1,88*		*−42,87 ± 1,91*

III. — DISCUSSION

1° Critique des résultats précédents

A la conclusion précédente, on peut opposer une critique. Comme le montrent les valeurs de l'ingestion azotée, les animaux des divers lots n'ont pas tous consommé la même quantité de nourriture au cours de la 2e période : dans l'ensemble ceux qui recevaient de l'alcool ou du vin ont mangé moins que les témoins ou les sujets qui recevaient de l'eau. C'est seulement au cours des périodes suivantes que la consommation de nourriture des premiers s'est relevée (voir le *tableau V*).

Les calories fournies par l'oxydation de l'alcool ne compensent pas la diminution de la quantité de nourriture ingérée par les rats des lots III et IV : un simple calcul montre que, pour des animaux dont le poids est compris entre 200 et 300 g, l'alcool ingéré fournit en moyenne 8 calories par jour, alors que le déficit énergétique au cours de la 2e période atteint 20 calories dans le lot III et 25 dans le lot IV, si l'on prend comme terme de comparaison la consommation moyenne des sujets du lot II qui reçoivent de l'eau. Au cours des 3e, 4e et 5e périodes, les animaux des mêmes lots III et IV continuent à ingérer moins de nourriture que ceux des lots I et II, mais le déficit énergétique, calculé de la même manière, est toujours inférieur à 12 calories, et le plus souvent de l'ordre de 6 à 8 : il correspond cette fois à l'apport calorique de l'alcool.

C'est donc seulement au cours de la 2e période que les animaux qui reçoivent de l'alcool dilué ou du vin, se sous-alimentent spontanément. Or, on peut craindre que leur organisme sous-alimenté ne fasse appel à ses protides tissulaires pour couvrir ses besoins caloriques : s'il en était

TABLEAU V

Consommation spontanée de nourriture des animaux des divers lots exprimée sous forme de matière sèche (1)

Périodes	Lot I (témoins)		Lot II (eau)		Lot III (alcool)		Lot IV (vin)	
	valeur absolue	valeur relative	valeur absolue	valeur relative	valeur absolue	valeur relative	valeur absolue	valeur relative
	g. p. jour		g. p. jour		g. p. jour		g. p. jour	
1e période	11,2	100	12,2	109	12,9	115	12,8	114
2e période	12,7	100	13,2	104	8,6	68	7,3	57
3e période	11,3	100	12,5	111	10,9	96	9,5	84
4e période	10,7	100	12,0	112	9,9	82	10,1	94
5e période	11,0	100	11,2	102	9,0	82	9,5	86

(1) Les valeurs relatives de la consommation au cours de chaque période ont été calculées en posant conventionnellement égale à 100 la consommation moyenne des sujets du lot I pendant la même période.

ainsi, l'élévation transitoire de la perte azotée urinaire qui se produit au cours de la 2e période serait due, non à un effet spécifique de l'alcool ou du vin, mais simplement à la sous-alimentation.

On peut évidemment opposer à cette objection le fait qu'au cours de la 2e période expérimentale, les animaux, tous adultes, disposent encore de réserves lipidiques importantes, ce qui dispense leur organisme de faire appel à ses protides tissulaires. Néanmoins, il nous a paru nécessaire d'examiner expérimentalement la valeur de cette critique.

2° Nouvelle expérimentation

Nous avons donc repris partiellement l'expérience décrite précédemment, en simplifiant son protocole et en en modifiant les conditions. Le nouveau schéma expérimental ne comprenait que les lots recevant respectivement de l'eau et de l'alcool dilué (lots II et III de l'expérience précédente), et se limitait aux 3 premières périodes de 5 jours.

Mais surtout, durant la 2e période, on a distribué aux animaux qui recevaient de l'eau, une quantité de nourriture restreinte, *égale à celle qu'ingéraient les rats qui recevaient de l'alcool*. Au cours de la 3e période, la nourriture a été distribuée de nouveau *ad libitum*.

	Quantités de nourriture ingérée (g. de matière sèche par jour).	
	Animaux recevant de l'eau.	Animaux recevant de l'alcool.
1re période.....	10,5 (ad libitum)	10,9 (ad libitum)
2e période	7,6 (restriction)	7,5 (restriction)
3e période	11,8 (ad libitum)	11,2 (ad libitum)

L'influence éventuelle de la sous-alimentation au cours de la 2e période étant ainsi évitée, les différences d'élimination azotée observées entre les 2 lots ne pouvaient plus provenir que d'un effet propre de l'alcool.

Or, comme le montrent les chiffres cités dans les *tableaux VI* et *VII*, le comportement des deux lots est nettement différent. Chez les Rats qui reçoivent de l'eau, la quantité d'azote urinaire s'abaisse fortement dès la 2e période, ce qui traduit une adaptation de leur organisme à leurs nouvelles conditions d'alimentation, plus rapide que dans l'expérience précédente. Au contraire, chez les Rats qui reçoivent de l'alcool, l'excrétion urinaire d'azote ne s'abaisse pas au cours de la 2e période : il faut attendre pour cela la 3e.

Ces faits sont clairement mis en évidence si l'on exprime les excrétions urinaires en valeur relative, en posant conventionnellement égale à

Tableau VI

Balance azotée de rats en inanition azotée : animaux recevant de l'eau

Périodes expérimentales	Rats	N ingéré	N fécal	N urinaire	N excrété total	Balance azotée
		mg par jour	mg par jour	mg par jour	mg par jour	mg par jour
1er-5e jours (sans eau)	28	4,17	13,20	61,60	74,80	− 70,63
	29	2,87	9,70	63,54	73,24	− 70,37
	30	4,32	17,26	69,40	86,66	− 82,34
	31	2,24	12,03	69,25	81,28	− 79,04
	32	3,20	19,12	59,74	78,86	− 75,66
	33	3,28	13,16	66,60	79,76	− 75,48
	34	4,86	18,83	60,20	79,03	− 74,17
	Moyennes			*64,33 ± 1,58*		*−75,53 ± 1,63*
6e-10e jours (avec eau) (1)	28	2,61	9,53	47,48	57,01	− 54,40
	29	2,61	9,38	43,76	53,14	− 50,53
	30	2,47	12,92	59,38	72,30	− 69,83
	31	2,61	12,93	46,08	59,01	− 56,40
	32	2,61	11,58	41,20	52,78	− 50,17
	33	2,61	10,97	49,00	59,97	− 57,36
	34	2,61	17,41	63,80	81,21	− 78,60
	Moyennes			*50,01 ± 3,15*		*−59,61 ± 4,02*
11e-15e jours (avec eau)	28	4,47	13,61	40,44	54,05	− 49,58
	29	4,54	13,08	44,52	57,60	− 53,06
	30	3,18	12,55	38,60	51,15	− 47,97
	31	4,54	14,34	35,08	49,42	− 44,88
	32	3,93	13,32	33,40	46,72	− 42,79
	33	3,57	11,67	39,44	51,11	− 47,54
	34	3,96	15,40	45,00	60,40	− 56,44
	Moyennes			*39,49 ± 1,87*		*−48,89 ± 1,77*

(1) Consommation de nourriture limitée, égale à la consommation des animaux qui reçoivent de l'alcool durant la même période.

100, dans chaque lot, l'excrétion azotée urinaire durant la 1re période :

	Excrétion azotée urinaire.	
	Animaux recevant de l'eau.	Animaux recevant de l'alcool.
	—	—
1re période.....	100	100
2e période	77	100
3e période	61	70

La sous-alimentation à laquelle se sont soumis spontanément les sujets qui recevaient de l'alcool ou du vin au cours de notre expérience principale, ne suffit donc pas à expliquer que leur excrétion azotée urinaire ait été, durant une courte période, nettement supérieure à celle des témoins ou des animaux qui recevaient de l'eau. Les différences observées paraissent bien dues à un effet spécifique des boissons alcooliques utilisées sur le catabolisme azoté.

TABLEAU VII

Balance azotée de rats en inanition azotée : animaux recevant de l'alcool

Périodes expérimentales	Rats	N ingéré	N fécal	N urinaire	N excrété total	Balance azotée
		mg par jour	mg par jour	mg par jour	mg par jour	mg par jour
1er-5e jours (sans alcool)	35	4,11	17,49	45,74	63,23	− 59,12
	36	3,34	21,72	53,84	75,56	− 72,22
	37	3,88	11,62	67,40	79,02	− 75,14
	38	3,58	20,26	61,46	81,72	− 78,14
	39	3,55	16,85	50,84	67,69	− 64,14
	40	3,09	14,40	48,00	62,40	− 59,31
	41	4,47	14,47	48,20	62,67	− 58,20
	42	3,79	12,81	52,30	65,11	− 61,32
	Moyennes			*53,40 ± 2,62*		*−65,95 ± 2,83*
6e-10e jours (avec alcool) (1)	35	2,61	16,45	59,36	75,81	− 73,20
	36	2,61	9,84	50,00	59,84	− 57,23
	37	2,38	10,01	56,44	66,45	− 64,07
	38	2,61	6,04	48,68	54,72	− 52,11
	39	2,54	10,60	55,20	65,80	− 63,26
	40	2,61	11,48	58,80	70,28	− 67,67
	41	2,61	14,53	51,46	65,99	− 63,38
	42	2,61	12,49	49,56	62,05	− 59,44
	Moyennes			*53,68 ± 1,36*		*−62,54 ± 2,27*
11e-15e jours (avec alcool)	35	4,48	17,81	40,64	58,45	− 53,97
	36	3,67	16,38	35,82	52,20	− 48,53
	37	4,09	10,38	34,24	44,62	− 40,53
	38	3,74	12,80	42,72	55,52	− 51,78
	39	3,27	12,48	39,42	51,90	− 48,53
	40	3,94	11,63	35,64	47,27	− 43,33
	41	3,53	13,74	40,56	54,30	− 50,77
	42	3,87	10,40	31,60	42,00	− 38,13
	Moyennes			*37,58 ± 1,35*		*−46,95 ± 2,00*

(1) Consommation de nourriture limitée, égale à la consommation des animaux qui reçoivent de l'eau durant la même période.

IV. — CONCLUSIONS

Nos expériences nous ont permis de comparer les valeurs de l'élimination intestinale et rénale d'azote endogène chez des rats adultes soumis à un régime ternaire donné seul, ou complété par l'administration quotidienne de quantités élevées et identiques d'eau, d'alcool dilué (10°) ou d'un vin rouge naturel (10°).

Pendant une courte durée, que nous ne pouvons évaluer avec précision, mais qui n'a pas dépassé 5 jours, l'alcool et le vin ont entraîné une « décharge » d'azote urinaire, l'élimination d'azote fécal n'étant pas sensiblement modifiée ; la balance azotée a donc été affectée dans un sens défavorable. Cette décharge ne paraît pas résulter d'un simple effet de « lavage » de l'urée préexistante du sang et des tissus : l'administration de volumes d'eau égaux aux volumes de dilution alcoolique ou de vin semble en effet provoquer un phénomène comparable, mais beaucoup plus atténué.

Nous insistons sur le caractère transitoire de l'effet observé : en 5 jours tout au plus, la perte d'azote urinaire endogène, chez les animaux qui reçoivent de l'alcool ou du vin, a pris la même valeur que chez ceux qui reçoivent de l'eau ou chez les témoins. Dans l'étude des effets de l'alcool sur le métabolisme azoté, il convient donc de tenir compte de la possibilité de phénomènes d'accoutumance.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Atwater (W. O.) et Benedict (F. G.). — An experimental inquiry regarding the nutritive value of alcohol. *Nat. Ac. of Sc.*, 1902, **8**, 235.

(2) Causeret (J.). — Recherches sur l'utilisation physiologique du calcium au cours de la croissance chez le Rat . Nouveaux aspects du rôle biologique de la vitamine D. *Ann. de Zootechnie*, 1954, **3**, 271.

(3) Clopatt (H.). — Ueber die Einwirkung des Alkohols auf den Stoffwechsel des Menschen. *Sk. Arch. für Physiol.*, 1901, **11**, 354.

(4) Flanzy (M.) et Causeret (J.). — Contribution à l'étude physiologique des boissons alcooliques. I. Étude comparée d'un vin et de l'alcool. *Ann. Technol. Agric.*, 1952, **1**, 227.

(5) Mèlka (J.). — L'augmentation de l'élimination de l'azote après une ingestion d'alcool est-elle une preuve de la décomposition toxique des protides ? *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **141**, 518.

(6) Miura (K.). — Ueber die Bedeutung des Alkohols als Eiweisssparer in der Ernährung des gesunden Menschen. *Ztschr. für Biol.*, 1892, **20**, 137.

(7) Mogiliansky. Cité par Lahille (A.). — Étude physiologique de l'alcool. *La Prophylaxie antivénérienne*, mars-avril 1946.

(8) Munk (I.). — Der Einfluss des Alkohols und des Eisens auf den Eiweisszerfall. *Arch. für Physiol.*, 1879, 163.

(9) Neumann (P. O.). — Ueber die Eiweisssparende Vraft des Alkohols. *Munch. Med. Woch.*, 1901, **48**, 1126.

(10) Offer (I. R.). — Inwiefern ist Alkohol ein Eiweisssparer ? *Wien. Klin. Woch.*, 1899, **12**, 1009.

(11) Pringsheim (J.). — Alkohol und Eiweissstoffwechsel. *Ztschr. für Diät. und physik. Therap.*, 1906, **10**, 274.

(12) Roseman (R.). — Der Einfluss des Alkohols auf den Eiweissstoffwechsel. *Pflügers Arch.*, 1901, **86**, 307.

(13) Rosenfeld (G.). — Der Alkohol als Nahrungsmittel. *Therap. der Gegenn.*, 1900, N. F. 2, 55.

(14) Rubner (M.). — Die Vertretungswerte der hauptsächlichsten organischen Nahrungsstoff in Tierkörper. *Ztschr. für Biol.*, 1883, **19**, 313.

(15) Terroine (E. F.) et Bonnet (R.). — Utilisation par l'organisme de l'énergie libérée par les oxydations et le problème de la valeur alimentaire de l'alcool. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1929, **11**, 1223.

OXYDATIONS ET RÉDUCTIONS EN CIDRERIE
ROLE DE L'OXYGÈNE DISSOUS DANS LES CIDRES

PAR

R. CREFF

Station de Recherches pomologiques et cidricoles, de Rennes

DEUXIÈME MÉMOIRE

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Introduction.

II. — Travaux effectués à la station.

1° Méthode de dosage de l'oxygène dissous.
2° Résultats.
a) Solubilité de l'oxygène dans les cidres.
b) Fixation de l'oxygène par les systèmes redox du cidre.
c) Dissolution de l'oxygène dans les cidres en fonction du temps et de la surface de contact.
d) Rôle protecteur de l'acide carbonique dissous.
e) Rôle de l'anhydride sulfureux.
f) Recherche des oxydases et des quinones.
g) Conclusions de ces essais.

III. — L'oxydation des cidres aux différents stades de la fabrication et du conditionnement.

1° Brassage et fabrication du moût.
2° Soutirages.
3° Manipulations sous gaz carbonique.
4° Centrifugation et filtration.
5° Embouteillage.

IV. — Les antioxydants.

1° L'anhydride sulfureux.
2° L'acide ascorbique.

V. — Conclusions générales.

I. — INTRODUCTION

Nous avons montré dans un précédent mémoire (1) l'importance de phénomènes d'oxydation et de réduction en cidrerie, les troubles les plus courants rencontrés dans les cidres étant provoqués par des phéno-

mènes d'oxydation. Le cidre très facilement oxydable, est donc très sensible à l'oxygène de l'air et nous avons voulu montrer la facilité de dissolution de l'air aux différents stades de la fabrication du cidre, fait qui est le plus souvent ignoré ou sous-estimé par les praticiens.

Ces phénomènes ont été étudiés pour les vins par J. Ribereau-Gayon (2) mais ceux-ci se différencient très nettement des cidres, du fait que, sauf certaines exceptions, les vins ne sont pas des boissons gazeuses. Des renseignements plus intéressants nous viennent de la brasserie et nous citerons en particulier, des études de Deux (3) et de Braems (3 bis), sur le rôle de l'oxygène en brasserie. La bière en effet, est une boisson gazeuse et comme le cidre est sujette à de nombreux troubles d'oxydation.

II. — TRAVAUX EFFECTUÉS A LA STATION

1° MÉTHODE DE DOSAGE DE L'OXYGÈNE DISSOUS

Pour effectuer le dosage de l'oxygène dissous dans les cidres, nous avons choisi une méthode chimique au carmin d'indigo et à l'hydrosulfite de soude : cette méthode avait été primitivement utilisée par Pasteur pour la bière, puis plus récemment par J. Ribereau-Gayon (2) dans sa thèse sur l'oxydation des vins et par J. Dupaigne pour les jus de fruits. Nous avons simplement modifié quelques détails opératoires.

Principe de la méthode. — Une quantité suffisante de carmin d'indigo bleu est réduite en son leuco-dérivé jaune, par l'hydrosulfite de soude. Une partie du leuco-dérivé fixe la totalité de l'oxygène dissous dans la solution à titrer et vire, de ce fait au bleu, par oxydation. Le carmin d'indigo oxydé est réduit à nouveau par l'hydrosulfite de soude. On peut ainsi en déduire la quantité d'oxygène dissous.

Tous les dosages doivent s'effectuer obligatoirement à l'abri de l'air.

Réactifs. — Solution aqueuse de carmin d'indigo à 40 g par litre. Solution d'hydrosulfite de soude à 2 g par litre dans l'eau bouillie, refroidie à l'abri de l'air, renfermant 10 g de carbonate de soude par litre.

Cette solution éminemment oxydable ne doit être préparée qu'en petite quantité et renouvelée très souvent.

Pratique du dosage. — L'appareil nécessaire pour effectuer le dosage est constitué par un flacon de Wolff à 3 tubulures supérieures et à une tubulure inférieure munie d'un robinet (fig. 1). Aux tubulures supérieures sont fixés respectivement un tube à robinet (*a*), une burette pour l'hydrosulfite (*b*) et un entonnoir à robinet (*c*) pour introduire le liquide à doser dans l'appareil. On peut d'ailleurs remplacer ce dernier par un tube muni d'un caoutchouc (*f*) fermé par une pince, sur lequel on fixe la pipette utilisée pour l'introduction du carmin ou du cidre dans l'appareil, ce qui

permet d'éviter tout risque d'oxydation pouvant résulter du contact de ces liquides avec l'air, dans l'entonnoir (RIBEREAU-GAYON (2)).

Pour effectuer le dosage à l'abri de l'air, RIBEREAU-GAYON chasse l'air du flacon par un courant d'hydrogène. Nous avons préféré opérer de façon différente, en remplissant complètement d'eau le flacon et la burette et en la déplaçant par du gaz carbonique. De cette façon on est plus assuré d'avoir chassé l'air que par la technique à l'hydrogène.

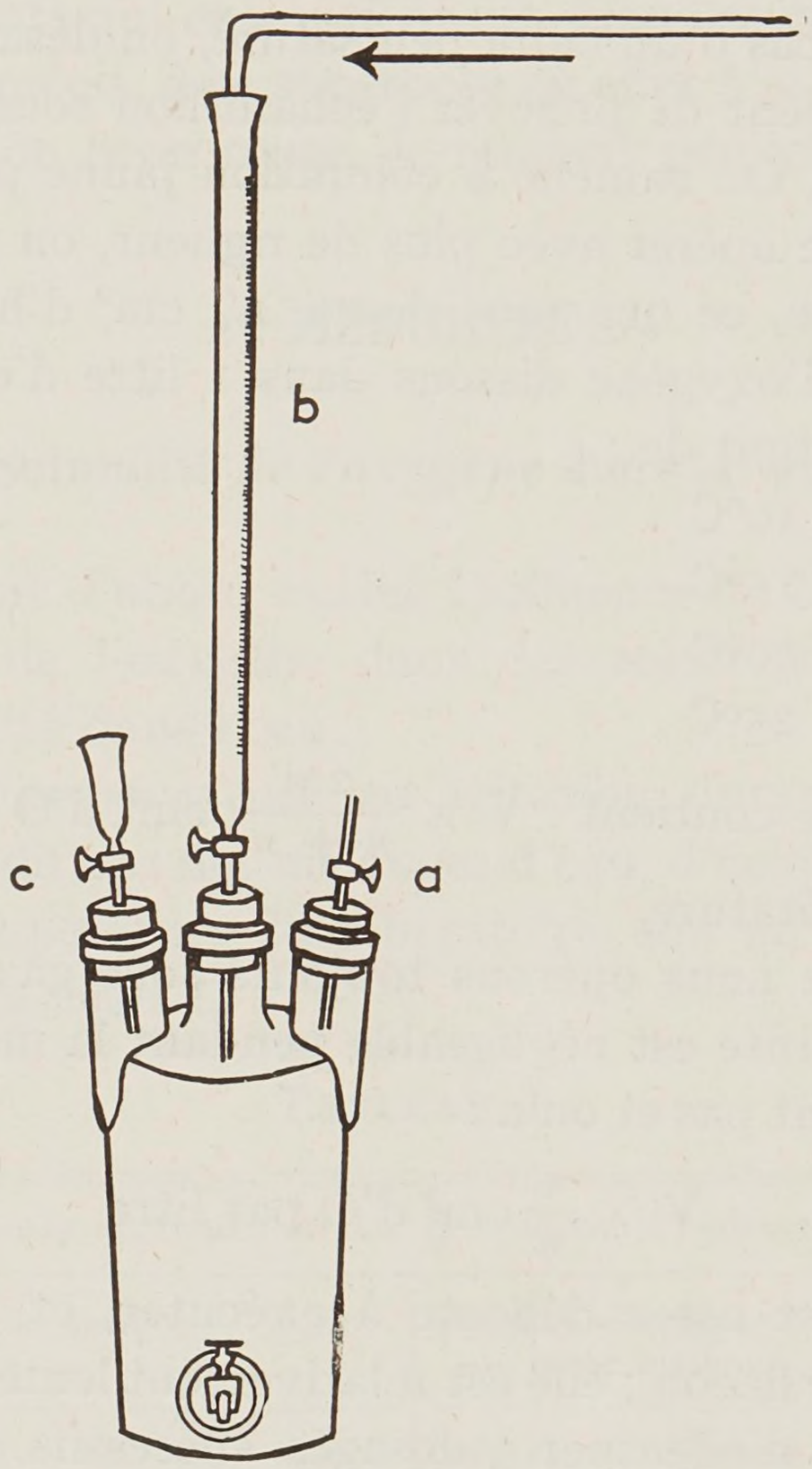


FIG. 1 — Flacon de Wolff à 4 tubulures équipé pour le dosage de l'O dissous.

L'acide carbonique utilisé doit être pur et notamment privé de toute trace d'oxygène. Ce gaz a été produit par attaque de marbre blanc par l'acide chlorhydrique dans un appareil de Kipp et épuré par passage dans une solution de bicarbonate de soude, dans une solution alcaline de pyrogallol et dans une solution d'hydroxyde manganeux (solution alcaline de sulfate de manganèse). Dans certains cas, le gaz carbonique peut renfermer de l'hydrogène sulfuré : on l'en débarrassera par lavage supplémentaire dans une solution de sous-acétate de plomb.

Le courant de CO_2 arrive par la burette, l'eau s'échappe par le robinet inférieur que l'on règle en fonction du débit du CO_2. On conserve 150 cm^3 environ d'eau au fond du flacon. Ajouter alors, par le caoutchouc (*f*),

5 cm³ de la solution de carmin, en utilisant le robinet (*a*) pour établir une dépression suffisante permettant l'introduction du liquide. La coloration bleue est ramenée au jaune par addition d'hydrosulfite. Introduire 50 cm³ de la solution d'eau saturée d'air par agitation ou barbottage sous léger vide : le carmin bleuit et on le ramène alors au jaune par n cm³ d'hydrosulfite. Opérer de même avec 50 cm³ du cidre à étudier. Si le cidre est bien saturé, ce qui est le cas d'un cidre bouché prélevé d'une bouteille intacte, il n'y a pas de précautions spéciales à prendre lors du prélèvement, mais dans le cas d'un cidre peu saturé, ou désaturé par une manipulation, il est prudent de prélever l'échantillon sous une légère couche d'huile de paraffine. On ramène à coloration jaune par n' cm³ d'hydrosulfite. Si l'on désire opérer avec plus de rigueur, on pratique un second dosage d'eau saturée, ce qui nous donne n'' cm³ d'hydrosulfite.

Le volume V d'oxygène dissous dans 1 litre d'eau ramené à 0° et 76 cm de mercure étant de :

7,2 cm³ à 10°C
6,5 cm³ à 15°C
6,0 cm³ à 20°C
5,7 cm³ à 25°C

Le jus examiné contient : $V \times \frac{2\,n'}{n + n''}$ cm³ d'O par litre en tenant compte de la température.

En fait comme nous opérons toujours sous gaz carbonique, l'oxydation de l'hydrosulfite est négligeable pendant la manipulation, le titre ne varie sensiblement pas et on a :

$$V \times \frac{n'}{n} \text{ cm}^3 \text{ d'O par litre}$$

La méthode est assez délicate à exécuter, et il faut éviter toute rentrée d'air dans le flacon ; elle est relativement lente, bien que le volume du flacon permette d'effectuer 3 dosages successifs, sans le vider. Elle donne des résultats satisfaisants et reproductibles, l'ordre des erreurs étant de 5 p. 100, ce qui n'est pas incompatible avec le but que nous poursuivons.

Ribereau-Gayon (2) a fait remarquer qu'il existait dans certains vins des corps autres que l'oxygène dissous, oxydant le carmin d'indigo, qu'il appelle oxydants intermédiaires : il suppose qu'il s'agit des métaux fer et cuivre toujours présents en quantités plus ou moins importantes. Des oxydants intermédiaires existent dans certains cidres riches en diastases oxydantes : ils pourraient être des formes peroxydiques des quinones, se formant par l'oxydation des tannoïdes sous l'action de polyphénoloxydases ou par catalyse métallique : ils oxyderaient le carmin par l'intermédiaire de peroxydases presque toujours présentes dans les cidres.

Si les complexes ferriques oxydent le carmin, la teneur en fer n'est

nullement négligeable puisque 10 mg de fer ferrique libèrent 1 cm³ d'oxygène en passant à l'état ferreux. Il y a là un point à vérifier, mais dans les dosages qui vont suivre, cette oxydation est négligeable, les cidres étudiés, fabriqués à la Station, contiennent très peu de fer, 2 mg au maximum, et les erreurs introduites par les complexes ferriques sont inférieures à celles admises pour la méthode.

De nombreux cidres industriels sont colorés artificiellement par des colorants catéchiques dérivés du cachou, introduits d'ailleurs souvent par les mélanges défécants qui en contiennent. Dans ce cas le dosage devient très difficile et peu précis, il se superpose en effet à la coloration jaune du virage, une coloration brun rouge, le rendant peu visible.

2° RÉSULTATS

a) Solubilité de l'oxygène dans les cidres

Nous avons tout d'abord évalué l'influence de l'alcool et des sucres sur la dissolution de l'oxygène dans des solutions synthétiques, par rapport à la solubilité dans l'eau.

Pour cela nous avons saturé par agitation, durant le même temps et dans les mêmes conditions des mélanges d'eau, d'acide malique, de sucres et d'alcool, à la température du laboratoire, soit 20°. Les résultats sont consignés dans le tableau I.

TABLEAU I

Mesures exprimées en cm³ de solution d'hydrosulfite			
Témoin eau distillée dans le verre...	2,05	Solution alcoolique à 5° : + acide malique 4 g/l	2,0
Acide malique 4 g/l	2,10	Solution alcoolique à 2°5 : + acide malique ..... + lévulose + glucose.....	2,10
Solution sucrée : Lévulose 30 g/l ..... Glucose 10 g/l	1,90	Solution alcoolique à 5°	2,10

La solution alcoolique à 2°5, sucrée et acidifiée est assez voisine des concentrations en alcool, en sucres et en acide malique des cidres doux. Celle à 5° acidifiée est voisine des concentrations en alcool et en acide malique des cidres secs, abstraction faite dans chaque cas des autres constituants organiques ou minéraux des cidres. Seuls, les sucres paraissent abaisser la solubilité, ceci étant dû probablement à l'augmentation de la viscosité.

RENTSCHLER et TANNER (4) opérant par polarographie notent un

abaissement de la solubilité de 10,7 p. 100 pour des jus de raisins de densité 1020 et de 9,60 p. 100 pour des solutions de sucre de canne de même densité : nous trouvons nous-mêmes, un abaissement de l'ordre de 8 p. 100. Pour les autres solutions, les différences obtenues restent dans la limite de l'erreur admise.

On peut donc conclure que pour des cidres, allant des cidres doux de densité 1020, aux cidres secs à 5° d'alcool réel, l'oxygène ainsi dosé est soluble dans les mêmes proportions que dans l'eau : nous avons vérifié ces faits, après saturation, par barbottage d'air pendant 1 heure, des cidres des variétés Chailleux, Blanc Mollet, Gilet Rouge, Dous Glas, Coquerelle, Reine des Hâtives, fabriqués à la Station, à partir de fruits sains et mûrs, cidres conservés en bouteilles depuis plus d'un an (tableau II) et sur un cidre du commerce, en bouteilles capsulées.

TABLEAU II

Mesures exprimées en cm³ de solution d'hydrosulfite

Variétés		Variétés	
Chailleux	2,55	Dous Glas	2,60
Eau témoin	2,55	Eau témoin	2,60
Blanc Mollet	2,70	Coquerelle	2,0
Eau témoin	2,65	Eau témoin	2,0
Gilet Rouge	2,70	Reine des Hâtives	2,0
Eau témoin	2,70	Eau témoin	2,0
Cidre du commerce	2,05		
Eau témoin	2,0		

Cette règle n'est pas valable pour des moûts, des cidres nouveaux, des cidres riches en peroxydases provenant de l'attaque des pommes par des moisissures ou très riches en fer et en cuivre. Un chiffre nettement supérieur lors du dosage, pourrait sans doute être l'indice d'une qualité défectueuse, pour des cidres stockés.

b) **Fixation de l'0 par les systèmes redox des cidres**

Il s'agissait de suivre la vitesse de fixation de l'oxygène dissous sur les systèmes redox des cidres. Des cidres aérés à saturation ont été placés dans des flacons fermés hermétiquement, sans air. Nous avons suivi la disparition de l'oxygène dissous en fonction du temps.

Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau III : on y trouvera le titre en hydrosulfite du cidre, celui du témoin, le rapport de ces deux chiffres, et l'erreur relative qu'il faut admettre sur ces rapports en sachant que le dosage s'effectue à 0,05 cm³ près. Ceci est de l'ordre des

résultats possibles : en effet, l'appréciation du virage est assez délicate dans les cidres car il se superpose à la coloration jaune du carmin d'indigo réduit, la coloration propre du cidre, plus foncée avec tendance vers le brun.

TABLEAU III

Mesures exprimées en cm³ de solution d'hydrosulfite

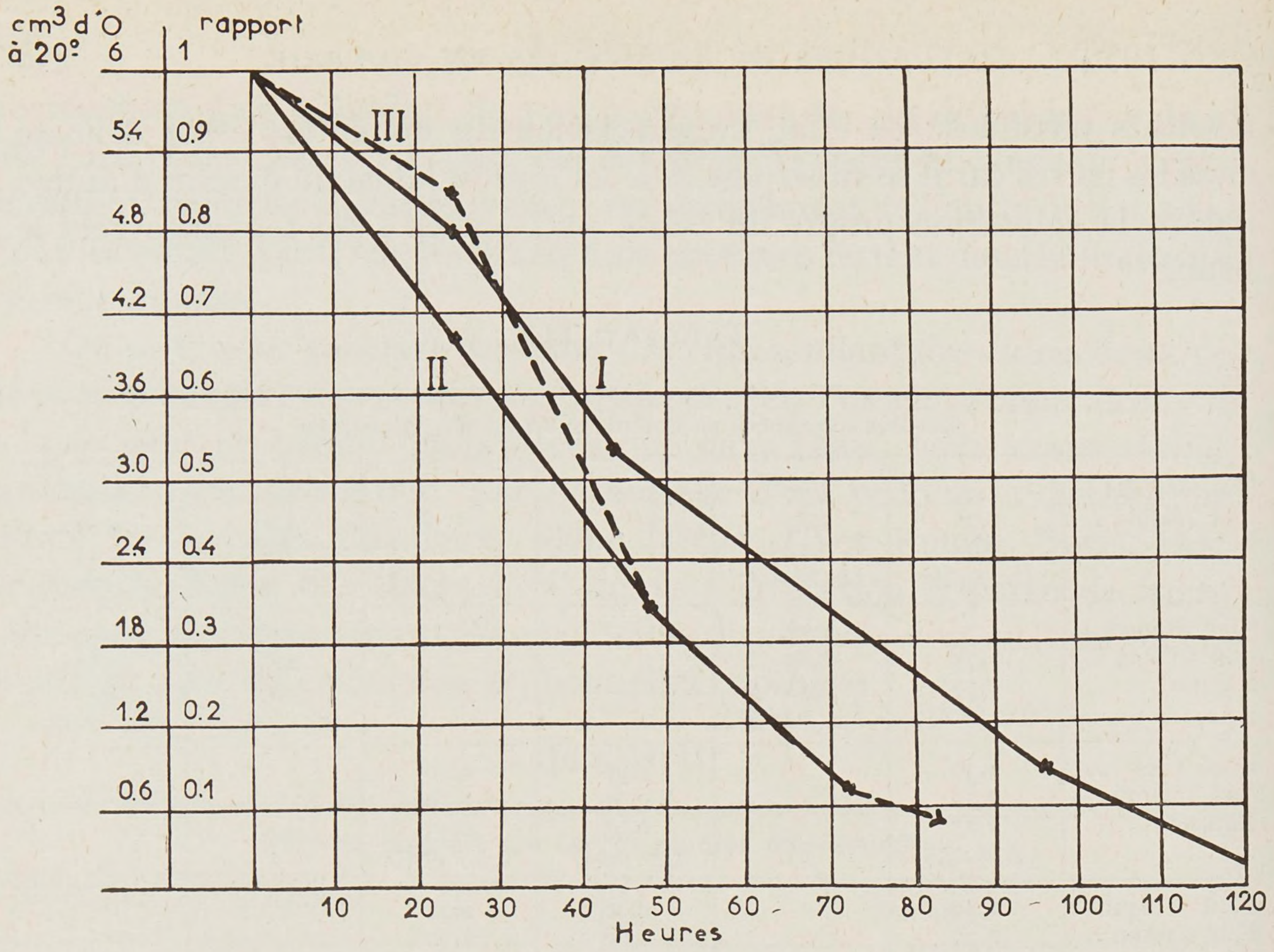
Blanc Mollet ..	1,45	1,50			0,45	0,10
Eau témoin ...	1,75	2,85			2,85	2,60
Rapport	0,83	0,525			0,16	0,03
	(± 0,05)	(± 0,025)			(± 0,02)	(± 0,015)
Gilet Rouge...	1,35	1,50			0,38	0,10
Eau témoin ...	1,75	2,85			2,85	2,60
Rapport	0,77	0,53			0,13	0,03
	(± 0,045)	(± 0,025)			(± 0,02)	(± 0,015)
Dous Glas	2,30		0,90	0,30		
Eau témoin ...	2,70		2,60	2,30		
Rapport	0,85		0,35	0,13		
	(± 0,035)		(± 0,02)	(± 0,025)		
Petit Fréquin..	1,80		0,90	0,30		
Eau témoin ...	2,70		2,60	2,30		
Rapport	0,67		0,35	0,13		
	(± 0,025)		(± 0,02)	(± 0,025)		
Temps.....	24 h.	43 h.	48 h.	71 h.	96 h.	120 h.

Les différences entre les différents résultats ne sont guère significatives si l'on considère l'erreur introduite. Il ne faut pas trop demander à ces essais : on peut cependant conclure que des cidres saturés en oxygène puis conservés à l'abri de l'air, contiennent encore de l'oxygène dissous de l'ordre de 0,5 à 0,6 cm³ au bout de 80 h., et que l'oxygène n'est entièrement fixé par les systèmes redox naturels qu'au bout de 120 h. Ces temps semblent d'ailleurs être des minima, les cidres étudiés conservés en bouteilles présentant leur pouvoir réducteur maximum, et la température de 20° étant très nettement supérieure à la température normale des caves de garde des cidreries.

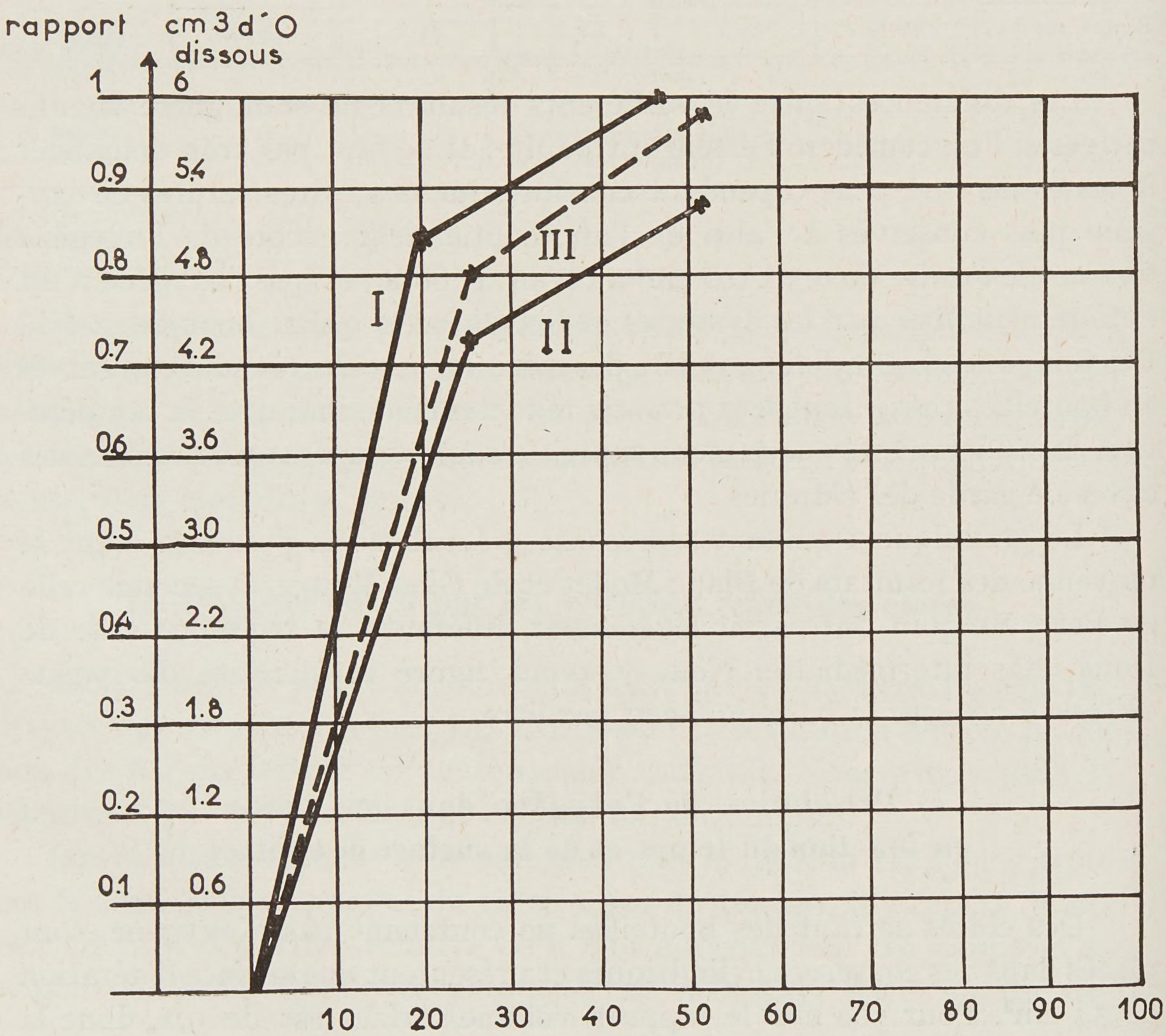
Le graphique 1 suivant représente 3 courbes : la première étant la moyenne des résultats de Blanc Mollet et de Gilet Rouge, la seconde celle de Petit Fréquin qui paraît légèrement différente, la troisième celle de Dous Glas intermédiaire. Nous y avons figuré la quantité d'oxygène dissous à 20°, sur la base de 6 cm³ par litre.

c) Dissolution de l'oxygène dans les cidres en fonction du temps et de la surface de contact

Des cidres sortant des bouteilles ne contenant pas d'oxygène, sont placés dans des conserves cylindriques et présentent une surface d'aération de 54 cm². Pour 500 cm³ le rapport volume/surface est de 9,2, donc la



GRAPHIQUE I. — 1 : Moyenne : Blanc Mollet, Gilet Rouge. — 2 : Petit Fréquin. — 3 : Dous Glas.



GRAPHIQUE II. — 1 : Moyenne : Blanc Mollet. Gilet Rouge. — 2 : Petit Fréquin. — 3 : Dous Glas.

hauteur du cidre est de 9,2 cm. Nous avons dosé l'oxygène dissous en fonction du temps, le prélèvement étant effectué au fond de la conserve. Les résultats sont consignés dans le tableau IV.

TABLEAU IV

Variétés	20 h.	24 h.	46 h.	51 h.
Blanc Mollet	1,50		2,0	
Eau témoin	1,75		2,0	
Rapport	0,85 (± 0,05)		saturé	
Gilet Rouge	1,40		2,0	
Eau témoin	1,75		2,0	
Rapport	0,80 (± 0,05)		saturé	
Dous Glas		2,05		1,65
Eau témoin		2,50		1,70
Rapport		0,80 (± 0,04)		0,97 (± 0,05)
Petit Fréquin		1,80		1,50
Eau témoin		2,50		e1,70
Rapport		0,72 (± 0,03)		0,88 (± 0,05)

On voit donc qu'au bout de 46 heures, les cidres se sont saturés. Comme dans l'essai précédent, le Petit Fréquin se distingue des trois autres. Il semble bien qu'il possède un système réducteur plus actif.

Ces faits permettent de penser qu'en quelques jours de contact à l'air, il existe à la surface du cidre, dans une cuve, une zone de saturation en oxygène atteignant au moins 10 cm d'épaisseur. RIBEREAU-GAYON (2) cite pour les vins les teneurs suivantes suivant la hauteur dans une cuve :

6 cm^3 pour 7 cm (saturé)
5,5 cm^3 pour 12 cm
4,7 cm^3 pour 18 cm
3,4 cm^3 pour 30 cm

soit par m^2 de surface 120 litres de vin saturé, et 300 litres saturé en moyenne aux trois quarts.

d) **Rôle protecteur de l'acide carbonique dissous**

Le CO_2 dissous dans le cidre joue sans aucun doute un rôle protecteur ainsi qu'il apparaît dans l'expérience suivante :

Une bouteille de cidre bouchée présente une pression intérieure mesurée à l'aphromètre de 1,5 kg environ. On y ajoute rapidement une solution de carmin d'indigo réduit par l'hydrosulfite. La bouteille refermée, la pression se rétablit à une valeur variable, supérieure en général à

1 kg. On entrouvre rapidement la bouteille, rebouche et attend à nouveau que l'équilibre de pression s'établisse. Ces dernières manipulations sont répétées plusieurs fois jusqu'à atteindre l'équilibre avec la pression atmosphérique. A partir de ce moment le cidre commence à se colorer par la surface. Il semble donc bien que, s'il n'y a pas d'agitation, le CO_2 protège le cidre de l'oxydation par la surface, à condition que celui-ci soit sursaturé, la pression du CO_2 étant supérieure à la pression atmosphérique.

Si l'on agite, le phénomène ne se passe plus de la même façon : il peut se dissoudre de l'oxygène, même si la pression intérieure est supérieure à la pression atmosphérique. Si l'on prend un échantillon de cidre bien gazeux, qu'on le place dans un flacon bouché avec un creux d'un tiers et qu'on agite assez longtemps, on trouve par dosage à l'hydrosulfite des quantités non négligeables d'oxygène dissous, bien que la pression à l'intérieur du flacon au moment du dosage soit nettement supérieure à la pression atmosphérique.

Trois échantillons de cidre, dont deux provenant de la Station, des variétés Coquerelle et Egyptia et un cidre industriel, ont été placés dans des tubes de 100 cm^3 avec un creux de 25 cm^3, puis bouchés et agités fortement pendant une demi-heure. Au bout de ce temps, ils contenaient, après dosage à l'hydrosulfite, la même quantité d'O que l'eau témoin, bien que la pression à l'intérieur des tubes fût encore supérieure à la pression atmosphérique.

Ceci s'explique d'ailleurs très facilement : les gaz oxygène et carbonique se dissolvent théoriquement suivant leur pression partielle dans le mélange gazeux au-dessus du liquide. Dans le premier cas, sans agitation les échanges gazeux se font de l'intérieur vers l'extérieur et comme il n'y a pas d'agitation, l'oxygène plus léger est chassé du col par le CO_2 qui se dégage. Dans le second cas, l'agitation brasse les deux gaz en formant un mélange homogène malgré la différence de densité, le contact oxygène-liquide est possible et se trouve favorisé par l'agitation. Le col contenant pratiquement 25 cm^3 d'air, la pression partielle de l'oxygène est très voisine d'un cinquième d'atmosphère comme dans l'air, et il est normal que l'on trouve une quantité d'oxygène dissous analogue à celle obtenue pour l'eau témoin. La protection par le CO_2 est uniquement mécanique en empêchant, ou en diminuant le contact de l'oxygène avec le liquide.

e) **Rôle de l'anhydride sulfureux**

Il semble admis dans certains ouvrages de cidrerie et d'œnologie que le SO_2 et les sulfites bloquent l'oxygène dissous, en se transformant en sulfates. Or, si l'on consulte divers travaux de chimie minérale sur l'oxydation des sulfites en solution en sulfates, on s'aperçoit que cette oxyda-

tion n'est possible qu'à des pH égaux ou supérieurs à 4, passant par un maximum aux environs de pH : 7. La plupart des cidres ayant des pH inférieurs à 4 cette forme d'oxydation ne doit pas se produire dans la plupart des cidres. Nous avons cependant opéré quelques essais pour vérifier ces résultats. Dans des conserves semblables, nous avons placé d'une part, un mélange de cidre de la Station, d'autre part le même mélange additionné de 200 mg de SO_2 sous forme d'une solution aqueuse de SO_2, soit d'une solution aqueuse de métabisulfite de potasse. Les échantillons sont laissés au contact de l'air pendant 24 h, puis l'oxygène dissous est dosé par la méthode à l'hydrosulfite. Les résultats sont consignés dans le tableau V. Les différences sont de l'ordre de 5 p. 100, donc de celui des erreurs admises.

TABLEAU V

Titre en hydrosulfite pour 50 cm³ de prise d'essai			
eau	cidre non traité	cidre + SO_2 solution	cidre + métabisulfite
3,0	3,0	2,90	2,85

La présence de SO_2 à la dose légale, ne diminue donc pas l'oxygène dissous, ou tout au moins cette fixation d'oxygène par le SO_2 paraît négligeable, ce que confirme l'essai suivant : le même mélange de cidre a été aéré jusqu'à saturation par barbottage d'air. On place alors dans des flacons bouchés émeri sans air, un échantillon témoin et 2 échantillons contenant 200 mg au litre de SO_2 soit sous forme de SO_2 en solution, soit sous forme de métabisulfite de potasse. Les résultats consignés dans le tableau VI nous donnent l'oxygène dissous restant dans le cidre au bout de 48 heures.

TABLEAU VI

Titre en hydrosulfite pour 50 cm³ de prise d'essai			
eau	cidre témoin	+ SO_2 en solution	+ SO_2 métabisulfite
2 cc	1,10	1,05	1,05

Là encore, la différence entre les cidres traités et non traités reste de l'ordre des erreurs admises. La fixation de l'oxygène par le SO_2 est nulle ou négligeable.

Cette conclusion est encore confirmée par un troisième essai, opéré sur deux mélanges différents de cidres de la Station. Un échantillon provenant d'une bouteille, donc non aéré, est placé rapidement avec du SO_2 en solution dans un flacon bouché émeri sans traces d'air. Un échantillon de même cidre, dégazé, puis saturé d'oxygène par barbottage d'air, est

mis dans les mêmes conditions que le précédent avec la même quantité de SO_2 en solution. On dose le SO_2 total et le SO_2 libre au bout de 24 heures par la méthode de RIPPER, appliquée aux cidres par WARCOLLIER et LE MOAL (5).

TABLEAU VII

	SO_2 en mg/l		
		Libre	Total
Mélange I :			
Prat Yeot	sans air	57	243
Doux Amer Gris	aéré	54	240
Fertile			
Mélange II :			
Coquerelle	sans air	51	198
Pontcadeuc	aéré	51	194

Les différences sont toujours de l'ordre des erreurs admises et ne sont donc pas significatives. La légère différence enregistrée entre les échantillons aérés et non aérés pourrait correspondre à l'oxydation de composés naturels des jus du type réductone, par exemple, qui facilement oxydables réagissent sur l'iode et interfèrent légèrement dans tous les dosages de SO_2 par la méthode RIPPER dans les cidres.

WARCOLLIER et LE MOAL avaient d'ailleurs montré que l'acide sulfureux contenu dans un moût muté ne subit pas d'oxydation sensible en milieu acide.

Nous conclurons donc qu'il n'y a pas d'oxydation directe du SO_2 et des sulfites en sulfates dans les cidres. Le pouvoir antioxydant du SO_2 doit être imputé à des réactions plus complexes mettant en jeu des quinones provenant de l'oxydation par catalyse métallique ou par catalyse diastasique de certains tannoïdes des cidres.

f) **Recherche des oxydases et des quinones**

Nous n'avons pas réussi jusqu'ici à mettre en évidence la présence de polyphénolase dans les cidres. Presque tous les cidres présentent la coloration à la teinture de gaïac fraîche en présence d'eau oxygénée, réaction caractéristique des peroxydases.

Aucun de ces cidres ne donne la coloration à la teinture de gaïac sans addition d'eau oxygénée, ils ne contiennent donc pas naturellement de peroxydes.

Cette conclusion semble confirmée par le dosage des quinones, les peroxydes du cidre pouvant être des formes peroxydiques des quinones. Tous les cidres étudiés au cours de notre étude nous ont donné un test négatif pour les quinones, à l'exception d'un cidre du commerce pour

lequel nous avons trouvé une quantité de quinone correspondant à 1/20000 de molécule. Le dosage était effectué par déplacement de l'iode de l'iodure de potassium en milieu chlorhydrique et dosage de l'iode libéré par le thiosulfate. Ce cidre contenait des colorants catéchiques et il ne nous a pas été possible de connaître l'origine des quinones formées.

g) **Conclusions de ces essais**

L'imperfection de la méthode de dosage limite les conclusions à tirer de ces travaux : on peut dire cependant que :

1° Un cidre sain doux ou sec peut dissoudre la même quantité d'oxygène que l'eau, soit sensiblement :

7,2 cm^3 à 10° C.
6,5 cm^3 à 15° C.
6,0 cm^3 à 20°C.

2° A cet oxygène physiquement dissous, peut s'ajouter de l'oxygène fixé sur des formes oxydées intermédiaires des tanins, si le cidre contient des oxydases, ainsi que de l'oxygène fixé sur les métaux dissous accidentellement, le fer en particulier.

3° La fixation de l'oxygène physiquement dissous par les constituants du cidre n'est pas immédiate. Pour des cidres très réducteurs, il faut au moins 80 heures pour fixer 6 cm^3 à 20°, 40 heures pour fixer 3 cm^3, 20 heures pour fixer 1 cm^3. La vitesse de fixation étant fonction de la température, la durée de fixation sera d'autant plus longue que la température sera plus basse : elle sera sensiblement le double à 10°, six fois plus lente à 3° ainsi qu'il apparaît d'après les travaux de RIBEREAU-GAYON sur des vins blancs sulfités (2).

Il en résulte qu'il existe à la suite d'une aération, même limitée, des cidres une possibilité de développement pour des microorganismes aérobies, pendant un temps assez important.

4° Il est faux de croire que le fait d'avoir sulfité un cidre avant de le manipuler, le met à l'abri de l'oxydation. La transformation directe du sulfite en sulfate n'est pas possible aux pH des cidres ; la formation du sulfate fait appel à des phénomènes bien plus compliqués, où le SO_2 intervient par son action sur des formes oxydantes intermédiaires, probablement de nature quinonique. En particulier le rôle du SO_2 dans la casse oxydasique ne s'explique pas par une fixation d'oxygène moléculaire dissous, mais soit par une inactivation de la polyphénoloxydase, soit plus probablement par formation avec le phlobaphène coloré et insoluble d'un leuco-dérivé incolore et soluble. Nous reviendrons sur cette question dans un prochain mémoire.

5° Le rôle protecteur du gaz carbonique dissous est important pour

les cidres au repos. Il ne faut cependant pas croire que la gazéification mette le cidre à l'abri de toute oxydation quelles que soient les manipulations qu'il subit par la suite.

6° Le rôle des métaux fer et cuivre, des tannoïdes et des oxydases semble très important dans les cidres et devra être étudié plus à fond.

C'est à eux que doit probablement être imputée la dissolution rapide de l'oxygène par la surface, alors que selon BRAEMS (3 *bis*) cette dissolution est négligeable au bout de 24 heures pour l'eau, les solutions d'ammonium quaternaire, d'acide ascorbique et les bières au repos.

III. — L'OXYDATION DES CIDRES AUX DIFFÉRENTS STADES DE LA FABRICATION ET DU CONDITIONNEMENT

Nous avons pensé qu'il était important d'attirer l'attention des cidriers industriels ou paysans sur les oxydations qui peuvent se produire au cours de la fabrication et du conditionnement des cidres, faits qu'ils ignorent le plus souvent.

1° BRASSAGE ET FABRICATION DU MOUT

Au moment du brassage il se produit une oxydation très intense sur la pulpe due à la présence de la polyphénoloxydase.

La fixation de l'oxygène dissous est très rapide, et 1 heure après le brassage, il ne reste pratiquement pas d'oxygène physiquement dissous, ainsi qu'il apparaît aux dosages au polarographe effectués par RENTSCHLER et TANNER (5) sur des jus de poires.

Pendant toute la fabrication le jus a fixé des quantités très importantes d'oxygène, sur les tannoïdes en particulier. BOGDANSKI (6) admet que des jus de pommes peuvent fixer 40 cm^3 d'oxygène à 8°, mesuré à l'appareil de WARBURG, ceci a un rythme rapide puisque DUPAIGNE et BOGDANSKI (7) citent une absorption au WARBURG de 8,2 cm^3 au litre en 5 minutes pour un jus de pommes Canada. On ignore encore le rôle des composants oxydés ainsi formés à partir des tannoïdes.

Il est probable qu'une partie d'entre eux se polymérisent en donnant des composés insolubles entraînés dans les lies, et que l'autre partie est ramenée à son état initial par la réduction liée à la fermentation. Il est possible que dans le cas des cidres doux où la fermentation est lente et le milieu assez peu réducteur il subsiste certains de ces composés oxydés jouant un rôle d'oxydants puissants.

2° SOUTIRAGE

Les soutirages sont de pratique courante en cidrerie paysanne et en cidrerie industrielle. Dans certaines régions, les cultivateurs ont tendance à pratiquer un nombre exagéré de soutirages. Il semble que l'on puisse se contenter d'un bon soutirage après défécation : à ce moment la fermentation étant à son début, l'oxydation présente peu de risques, mais il faut éviter par la suite tout contact du cidre avec l'air et tout spécialement pour des cidres doux stabilisés aux densités comprises entre 1030 et 1020.

Il est recommandé dans tous les cas d'éviter :

1° de faire arriver le cidre à la partie supérieure du fût de réception, ce qui provoque un dégazage brutal avec perte de CO_2 et une dissolution d'air par émulsion ;

2° de faire couler le cidre dans un entonnoir, ce qui provoque un dégazage et augmente la surface de contact du cidre avec l'air ;

3° de provoquer des tourbillons à la surface descendante ou à la surface montante du liquide.

Les méthodes de soutirage au broc et à la cannelle, ou au soufflet sont à proscrire. La meilleure méthode consiste à opérer par siphonnage en faisant arriver le cidre au fond du fût ou de la cuve de réception, mais cette technique n'est réalisable que s'il existe une différence de niveau entre les cuves ou les fûts à vider ou à remplir.

Le soutirage par contre-pression de gaz carbonique permet d'opérer à l'abri de l'air et évite l'utilisation des pompes qui provoquent les oxydations les plus courantes.

Lorsqu'on utilise une pompe, il faut maintenir un rythme assez lent pour réduire au maximum l'émulsion d'air dans le corps de pompe. Il faut veiller à maintenir des presses-étoupes étanches, vérifier l'étanchéité complète des raccords sur la canalisation, utiliser des tuyaux de caoutchouc en bon état, non poreux, sinon il se produira au sein du cidre, des bulles fines et nombreuses qui risqueront de le saturer d'air.

Braems (3 bis) recommande d'éviter les tuyauteries descendantes de surface trop grande pour le débit, dans lesquelles le liquide tombe sous forme de filets ou de gouttes très oxydables, la canalisation doit toujours être pleine de liquide.

Il convient également d'éviter toutes poches d'air dans les canalisations. Ribereau-Gayon (2) travaillant sur des vins, a noté une dissolution de 3 à 4 cm^3 d'oxygène si l'on fait arriver le liquide en jet au sommet du fût, de 1,3 cm^3 si on le fait arriver en gros bouillons, de 1 à 2 cm^3 par suite de l'existence de poches d'air dans les canalisations.

L'effet protecteur du CO_2 dans les cidres doit limiter cette oxydation ;

elle est loin d'être négligeable, mais elle dépend de l'état de division du CO_2 dans le cidre. Un cidre saturé naturellement par le gaz carbonique de fermentation sera mieux protégé contre l'oxydation qu'un cidre gazéifié artificiellement d'où le CO_2 s'échappe rapidement sous forme de grosses bulles et se désature donc vite.

3° MANIPULATIONS SOUS GAZ CARBONIQUE

Dans les cidreries industrielles modernes, on tend de plus en plus à conserver le cidre sous pression de gaz carbonique dans des tanks émaillés : les transvasements et les soutirages peuvent se faire sans oxydation notables. Il y a cependant un certain nombre de points qui méritent d'être précisés.

Le CO_2 commercial en tubes est souvent très impur et contient des quantités notables d'oxygène pouvant aller jusqu'à 5 à 6 p. 100. Le CO_2 commercial le plus pur est de 99,8 p. 100. On voit donc qu'un tank contenant du CO_2 sous un atmosphère renferme sensiblement 2 cm^3 d'O par litre qui pourront se dissoudre dans le cidre qu'on y introduira. La quantité d'oxygène introduite devient catastrophique avec du CO_2 de plus faible pureté. Il est prudent, quand on utilise du CO_2 en tubes de laisser dégager dans l'atmosphère une petite quantité de son contenu avant de l'utiliser : on admet en effet, que l'oxygène, impureté du CO_2 est gazeux à la pression du tube et occupe la partie supérieure de celui-ci, au-dessus du gaz carbonique liquéfié, qu'il se dégage d'abord quand on ouvre le tube, ce qui permet ainsi d'obtenir ensuite du CO_2 presque pur.

La pression partielle de l'O, donc son coefficient de solubilité dans le cidre, sera très faible dans le cas du CO_2 à 99,8 p. 100. Les réactions d'oxydation liées à la concentration de l'oxygène seront donc ralenties, mais on voit que même dans ce cas, il peut se produire des phénomènes lents d'oxydations, difficilement prévisibles.

En brasserie, on recommande lors des carbonatations en tanks d'éliminer au début le gaz de la partie supérieure du tank nettement plus riche en oxygène, par suite de sa plus faible solubilité (DEUX (3)), mais c'est là un artifice de rendement discutable.

4° CENTRIFUGATION ET FILTRATION

Les centrifugeuses utilisées actuellement en cidrerie travaillent sous pression de gaz carbonique à l'abri théorique de l'air. Il ne faut cependant pas s'illusionner sur l'étanchéité absolue de ces appareils et il convient de se méfier des variations de vitesse, liées à des sautes de courant ou d'alimentation en cidre : l'oxydation est d'autant plus grave que dans

ce cas, l'air aspiré est émulsionné dans la masse et le rôle protecteur du CO_2 devient illusoire.

Là encore, il faut éviter toutes fuites dans les canalisations qui risquent de faire pénétrer dans le liquide des quantités importantes d'oxygène par un effet d'aspiration de trompe à eau.

Les filtres eux-mêmes sont des sources non négligeables d'oxydation, les gâteaux de masse apportent de l'air occlus sous une forme très divisée. DEUX (3) étudiant la filtration des bières, conclut que même en prenant les plus grandes précautions, on dissout 0,3 cm^3 d'oxygène par litre.

On oublie très souvent de vidanger l'air contenu dans les canalisations, les centrifugeuses et les filtres. Or la centrifugeuse la plus utilisée en cidrerie a une contenance intérieure de 75 litres, si on compte 20 litres de contenance pour les canalisations et 75 litres pour un filtre, on voit que même en opérant sous gaz carbonique, on introduit lors d'une centrifugation suivie d'une filtration 170 litres d'air, soit 34 litres d'oxygène dans le liquide si l'on n'a pas soin de purger les canalisations, filtres, centrifugeuses de l'air contenu. Pour cela il faut remplir l'ensemble tank de réception, centrifugeuse, filtre et canalisations d'eau que l'on chasse par une légère surpression de gaz carbonique pur.

En opérant avec le plus grand soin et en chassant l'eau du tank de réception par du CO_2 contenant 0,2 p. 100 d'oxygène, on voit qu'on introduit tout de même 40 litres d'oxygène dans un tank de 200 hectos, soit 2 cm^3 par litre. Si l'on omet par surcroît de chasser l'air des canalisations, on introduit dans l'exemple précédent de centrifugation et filtration 74 litres pour 200 hectos, soit 3,7 cm^3 par litre, donc plus de la moitié de l'oxygène que l'on introduirait à saturation en manipulant à l'air.

5° EMBOUTEILLAGE

On tend de plus en plus à utiliser des tireuses isobarométriques grâce auxquelles la pression de gaz dissous dans le liquide reste constante, ce qui évite le dégazage pendant l'embouteillage. Il semble donc que si l'on opère avec des cidres bien saturés sous une légère surpression et à plus forte raison avec des cidres en tanks sous pression, il ne puisse se produire d'oxydation au cours de cette manipulation. Malheureusement, il n'en est rien pour deux raisons principales :

— les tireuses isobarométriques actuelles maintiennent effectivement la pression dans le liquide, mais ceci au prix d'un artifice gênant si l'on considère l'oxydation possible. L'air des bouteilles retourne dans le réservoir de charge par un tube capillaire ; il en résulte que l'atmosphère dans ce réservoir contient des quantités d'oxygène de plus en plus importantes au fur et à mesure que le nombre de bouteilles remplies augmente. Il se produit donc probablement, lors de l'embouteillage, une

dissolution d'oxygène non négligeable. Des tireuses actuellement à l'étude pour la bière, élimineraient cet inconvénient en rejetant l'air de la bouteille à l'extérieur, la contre-pression étant maintenue par un apport extérieur de gaz carbonique.

Braems (3 bis) fait remarquer que la canule d'embouteillage constitue un injecteur imparfait. Il recommande d'éviter les jets en pomme d'arrosoir et de se rapprocher le plus possible du jet cylindrique lisse, de réduire la hauteur de chute libre du liquide dans la bouteille au minimum, soit 2,5 à 3 cm du fond, et d'éviter les canules vidantes qui, se remplissant d'air à chaque opération, entraînent dans la bouteille suivante, l'air qu'elles contiennent, sous une forme divisée favorable à la dissolution.

D'autre part, il existe avec toutes les tireuses un vide au-dessus du liquide dans la bouteille, au moins égal au volume du tube de remplissage, même si l'on remplit la bouteille au maximum. L'air pénètre dans le goulot lorsque le tube de remplissage est retiré et le col au-dessus du liquide qui est sensiblement de 10 cm^3, contient un mélange plus ou moins riche en oxygène, suivant que le cidre est plus ou moins saturé en CO_2. Il est d'ailleurs bon de noter que, dans certains systèmes de brasserie, on limite au minimum la teneur en oxygène de ce col en faisant mousser la bière, soit en frappant la bouteille, ce qui déclenche un dégagement de CO_2, soit en injectant du CO_2 dans le col des bouteilles, soit même en remplissant au préalable la bouteille de CO_2 à l'aide d'un injecteur. Deux (3) note cependant que, malgré cet artifice, on n'arrive jamais à débarrasser entièrement le col de la bouteille de l'oxygène contenu, l'élimination se chiffrant ainsi à 30 et 40 p. 100 de cet oxygène.

Ce qui précède concerne des bouteilles remplies au maximum de cidre, mais dans la pratique courante on utilise de plus en plus des bouteilles dites « sténies », conçues pour permettre la pasteurisation en bouteilles, qui présentent une contenance totale de 1040 cm^3 environ pour la bouteille de 1 litre, de 270 cm^3 pour le quart, de 360 cm^3 pour le tiers, d'où un col de 40 cm^3, 20 cm^3 et 27 cm^3 de capacité environ, pour chacun de ces types de bouteilles. Il peut donc se trouver théoriquement dans la bouteille outre l'oxygène physiquement dissous dans le cidre, ou fixé sur des composés instables, 8, 4 et 5,4 cm^3 d'oxygène respectivement. En pratique, il y en a moins, si le cidre est bien gazeux.

Il est actuellement de pratique courante de gazéifier artificiellement les cidres avant la mise en bouteilles, les objections que nous avons déjà formulées sur la pureté du gaz carbonique restent valables également dans ce cas.

En cidrerie paysanne, il faut éviter lors de l'embouteillage, de faire couler le cidre sur les parois et de le faire arriver en gros bouillons. Pour éviter cette désaturation, on recommande de le faire arriver au fond

de la bouteille à l'aide d'un tuyau de caoutchouc fixé sur la cannelle, à une vitesse telle qu'il ne se produise pas de tourbillons. Il est bon de remplir la bouteille à ras du goulot, de boucher à ras du liquide, en supprimant ainsi toute chambre à air dans la bouteille. Un cidre paysan soutiré une seule fois entre deux lies après défécation, avant le départ de la fermentation ; conservé en fûts ouillés régulièrement et sous une légère surpression, grâce à des bondes aseptiques, puis embouteillé sans chambre à air, ne contient que des quantités négligeables d'oxygène dissous.

IV. — LES ANTIOXYDANTS

Parmi les produits légaux pouvant être utilisés, seul le SO_2 semble avoir un intérêt pratique pour lutter contre les phénomènes d'oxydation. Il ne semble pas recommandé d'ajouter des tanins ou des colorants catéchiques, leur rôle dans les phénomènes d'oxydation tant en cidrerie qu'en œnologie étant loin d'être connu. Cependant, l'acide ascorbique étant actuellement autorisé dans un certain nombre d'industries alimentaires et de fermentation, brasserie et fabrication des jus de fruits en particulier, nous avons pensé qu'on pouvait envisager son utilisation en cidrerie, sous réserve de l'extension à cette industrie de l'autorisation d'emploi. Nous étudierons donc, étant donné les connaissances actuelles l'opportunité d'addition d'acide sulfureux et d'acide ascorbique dans les cidres pour lutter contre les phénomènes d'oxydation.

1° L'ANHYDRIDE SULFUREUX

En dehors de ses propriétés antiseptiques que nous n'avons pas à discuter ici, les travaux de la Station ont montré que dans un cidre normal et sain, le SO_2, soit sous forme de solution gazeuse, soit sous forme de métabisulfite ne fixe en aucun cas l'oxygène moléculaire dissous. Son rôle dans certains phénomènes d'oxydation, la casse oxydasique en particulier, s'explique par son action sur certains composés des tanins : le processus exact d'action ne semble pas encore bien connu. L'hypothèse d'inactivation de la polyphénolase par le SO_2 semble insuffisante ; en effet, par action du SO_2 sur des cidres atteints de casse oxydasique ou des moûts oxydés sortant de pression, on note non seulement un arrêt du brunissement, mais un éclaircissement notable du cidre ou du moût. Il se superpose donc au phénomène d'inactivation, soit un phénomène de réduction, théoriquement possible avec les quinones, soit une formation de composés sulfités incolores.

Le fait de mècher un fût jusqu'à refus permet-il de réduire le phénomène d'oxydation ? Ce point semble contreversé : en œnologie RIBE-

REAU-GAYON (2) estime que la quantité d'oxygène éliminée par la combustion n'est pas suffisante pour réduire sensiblement la quantité d'oxygène qui se dissout dans le vin. Il cite quelques chiffres obtenus dans des fûts de 225 litres, en brûlant 21 grammes de soufre. Les gaz contenus dans le fût avaient une teneur de 15,3 p. 100 d'oxygène au lieu de 21 p. 100 dans l'atmosphère. La combustion du soufre s'arrêtant au delà, il est impossible d'éliminer par ce moyen une plus grande quantité d'oxygène.

Un cidre sain ne présentant pas de phénomènes oxydasiques fixant 6 cm³ d'oxygène à 20° par saturation à l'air, ne fixerait plus que 4,30 cm³ dans un fût méché jusqu'à arrêt de la combustion du soufre. Cet abaissement de l'oxygène n'est peut-être pas négligeable, et nous comptons étudier si cette technique présente un intérêt pratique.

2° L'ACIDE ASCORBIQUE

L'acide ascorbique est un réducteur puissant puisque son potentiel d'équilibre d'oxydo-réduction est de 14 en unités rH et que son potentiel limite, lorsqu'il est entièrement réduit est voisin de 12 unités rH. On comprend donc qu'on ait envisagé son utilisation comme antioxydant dans les boissons. Mais il est bon de remarquer :

1° que si l'acide ascorbique s'oxyde par l'oxygène en donnant de l'acide déhydroascorbique en milieu neutre ou basique, les produits d'oxydation en milieu acide, donc dans les cidres, sont des corps différents de l'acide déhydroascorbique

2° il en résulte que le système acide ascorbique-déhydroascorbique théoriquement possible, n'existe dans les boissons que pendant un temps très court. Le système est pratiquement irréversible, ce qui revient à dire que l'acide ascorbique ajouté disparaît du milieu pour donner d'autres acides non réducteurs, et que le retour en milieu réducteur de la boisson, soit par les systèmes redox naturels, soit par un léger départ de fermentation, ne régénère pratiquement pas l'acide ascorbique ;

3° le cuivre et le fer jouent un rôle catalytique important dans son oxydation et dans la destruction de l'acide déhydroascorbique ; l'acide ascorbique en excès disparaît rapidement en présence de ces métaux ;

4° lors de cette oxydation catalysée par les métaux, il se formerait de l'eau oxygénée (8) et (9). Or comme nous l'avons vu, les cidres semblent contenir des peroxydases, d'où possibilité d'une nouvelle oxydation ;

5° l'acide ascorbique réduit les formes oxydées des polyphénols non polymérisées. Il en résulte que dans un cidre présentant des oxydases, l'acide ascorbique fixe non seulement l'oxygène dissous physiquement, mais encore l'oxygène fixé chimiquement sur les tannoïdes.

Il en résulte au point de vue pratique que :

1° l'acide ascorbique étant donné son prix élevé est inutilisable dans les jus, les cidres jeunes, les cidres présentant de la casse oxydasique, qui contenant des oxydases sont riches en formes oxydées des tannoïdes et fixeront donc par leur réduction, des quantités importantes d'acide ascorbique. BOGDANSKI qui a étudié cette question pour les jus frais estime qu'il faut utiliser 700 mg par litre environ pour empêcher tout brunissement oxydasique. Or l'arrêté du 21 mai 1953, qui autorise l'emploi d'acide ascorbique dans les bières, sirops, limonades, sodas et boissons sans alcool, spécifie que la teneur en acide ascorbique ne doit pas être supérieure à 300 milligrammes par kilogramme de produit prêt à la vente. Il y a là un problème analytique important, suivant que l'on tolère 300 mg d'acide ascorbique proprement dit sous la forme réduite sans tenir compte de la forme déhydroascorbique, ou dans le cas contraire 300 mg de vitamine C, soit la somme acide ascorbique réduit et acide déhydroascorbique oxydé. Si l'on admet cette seconde hypothèse, des doses de l'ordre de celles conseillées par BOGDANSKI deviennent illégales ;

2° le traitement par l'acide ascorbique n'est justifiable que dans des liquides dépourvus de fer ou de cuivre ou n'en contenant que de faibles traces, complexées naturellement dans le milieu. Ce n'est peut-être pas le cas des cidres industriels qui doivent contenir toujours du cuivre en quantité appréciable, métal apporté par les robinetteries et tuyauteries en cuivre plus ou moins bien étamées et entretenues, ainsi que par les corps de pompes. Les cidres fermiers sont eux, souvent trop riches en fer. Une étude est en cours sur le rôle véritable du cuivre et du fer dans les cidres. Mais il est certain que si l'utilisation de l'acide ascorbique se généralise, il faudra substituer aux robinetteries et corps de pompes en cuivre des robinetteries en acier inoxydable ou même en matières plastiques, sinon l'acide ascorbique serait détruit très rapidement, avec formation partielle d'eau oxygénée dont l'action risque d'être encore plus grave que celle de l'oxygène moléculaire dissous ;

3° l'irréversibilité du système acide ascorbique-acide déhydroascorbique fait que l'acide ne saurait jouer un rôle stabilisant des phénomènes d'oxydation. Le fait d'ajouter de l'acide ascorbique ne dispensera pas des précautions habituelles pour éviter l'oxydation. Il faudra rajouter de l'acide ascorbique toutes les fois qu'il se trouvera de l'oxygène dissous ;

4° lors de l'utilisation de l'acide ascorbique, il faudrait tenir compte en sus de l'oxygène dissous, de l'oxygène fixé sur le fer et sur les tannoïdes, de l'oxygène de l'air au-dessus du liquide. En particulier dans le cas de cidre en sténies, il faudra rajouter 16 mg pour 5 cm^3 de col qui contiennent sensiblement 1 cm^3 d'oxygène.

Il en résulte que dans le cas d'un cidre saturé à 20° contenant 6 cm^3 d'oxygène dissous, pas d'oxydases et 10 mg de fer, embouteillé en sté-

nies de 1 litre, avec une chambre à air de 40 cm³, il faudra rajouter :

96 mg pour l'oxygène dissous,

1,5 mg par mg de fer, soit 15 mg,

128 mg pour l'air du col,

soit 239 mg d'acide ascorbique au litre.

Un calcul analogue montre qu'il faudra 98 mg par sténies d'un quart présentant une chambre à air de 22 cm³ et 118 mg pour une sténie d'un tiers de litre présentant une chambre à air de 27 cm³.

Il est évident que le dosage de l'oxygène dissous étant long et délicat, accessible seulement à des chimistes avertis, les calculs ont été effectués sur la base de la saturation, et en négligeant d'autre part l'influence éventuelle du cuivre et des oxydases. Il est pratiquement impossible pour un cidrier d'opérer autrement.

Il résulte de tout ceci que l'addition de l'acide ascorbique ne serait vraisemblablement possible et intéressante qu'à des cidres de qualité. On peut envisager aussi son utilisation dans le cas de la pasteurisation en bouteilles où l'addition d'acide ascorbique serait peut-être susceptible d'éviter en partie le goût de cuit. On pourrait se baser pour des essais préliminaires sur les chiffres préalablement cités, et mettre au point directement la fabrication par des essais en usine ; en effet les essais que nous pourrions poursuivre au laboratoire seraient trop différents de la réalité industrielle et ne pourraient servir que de point de départ.

L'addition d'acide ascorbique présenterait peut-être un certain intérêt pour lutter contre le développement de la maladie dite du framboisé. Celle-ci paraît bien en effet être déclenchée par une aération, qui si l'on admet la théorie de la symbiose bactéries oxydantes-levures dans cette maladie, provoque le développement des bactéries, suivi d'un nouveau départ de fermentation alcoolique, avec production anormale d'éthanal.

Il semblerait théoriquement possible d'empêcher ou de ralentir ces proliférations bactériennes en fixant immédiatement l'oxygène dissous par de l'acide ascorbique. Dans ce cas, comme dans celui de la pasteurisation, il faudrait tenir compte de l'oxygène de la chambre à air, s'il s'agit d'un traitement en bouteilles au moment de l'embouteillage, ou de l'oxygène du creux, s'il s'agit d'un traitement en tank après centrifugation et filtration. Nous tenons à insister sur le fait qu'en aucun cas, l'addition d'acide ascorbique ne saurait guérir un cidre où la formation anormale d'éthanal est déjà déclenchée, et à priori réduire l'éthanal polymérisé ou fixé sur les tannoïdes.

Cette réaction ne paraît en effet guère possible, le potentiel d'équilibre du système alcool-éthanal étant très bas, de l'ordre de 7 unités rH, alors que le potentiel limite que l'on peut atteindre avec l'acide ascorbique est de 12 unités rH. De plus, si cette réaction était possible, elle

nécessiterait l'emploi de doses d'acide ascorbique beaucoup trop élevées tant au point de vue légal qu'au point de vue économique, puisqu'il faudrait 4 mg d'acide ascorbique pour réduire 1 mg d'éthanal.

Le traitement dont l'intérêt ne peut apparaître qu'après de nombreux essais en cidrerie, ne peut donc être que préventif.

Nous conclurons ce paragraphe, en résumant brièvement les idées principales :

L'acide ascorbique, relativement coûteux, n'est utilisable que pour des cidres d'une fabrication impeccable, dépourvus de cuivre, de fer et d'oxydases, sous réserve d'ailleurs d'essais systématiques en cidrerie. Il ne dispense pas des précautions habituelles de propreté et de lutte contre l'aération.

Il ne peut jouer le rôle de tampon d'oxydo-réduction, mais simplement de réducteur. Son emploi ne sera vraiment économique et logique que dans une cidrerie disposant d'un laboratoire et d'un chimiste qualifié. L'arrêté du 21 mai 1953 ne mentionnant pas le cidre, il conviendrait, avant de l'utiliser de façon généralisée, d'obtenir son autorisation d'emploi.

L'acide ascorbique, pas plus qu'aucun produit chimique légal, ne peut constituer la panacée susceptible de dispenser le cidrier de prendre toutes les précautions nécessaires pour s'assurer des cidres de qualité.

V. — CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Dans ce mémoire, nous avons voulu attirer l'attention des cidriers sur les dangers de l'oxydation, en cidrerie. Nous avons montré que le cidre est très avide d'oxygène et que tout doit être mis en œuvre pour le soustraire au contact nocif de l'air.

Nous avons voulu mettre en garde contre certaines idées préconçues et erronées, et nous conclurons en disant que le moyen le plus simple et le plus économique pour éviter, en cidrerie, les troubles d'oxydation, notamment les casses oxydasique et ferrique, ainsi que le framboisé, consiste toujours à travailler des fruits sélectionnés, propres et sains, dans des installations rationnelles et bien entretenues : on obtiendra ainsi des cidres sains, pauvres en cuivre, en fer et en oxydases qui, manipulés avec soin et vigilance, de façon à éviter des oxydations exagérées, conserveront toutes leurs qualités premières et seront à l'abri de ces accidents.

Reçu par publication le 13 octobre 1955.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Creff (R.) et Jacquin (P.). — Oxydations et réductions en cidrerie premier mémoire. *Ann. Techn.*, I. N. R. A., 1955, nº 2, p. 141-167.
(2) Ribereau-Gayon (J.). — Contribution à l'étude des oxydations et des réductions dans les vins. Thèse Sciences Physiques. Bordeaux 1931 et Traité d'Oenologie. Librairie Polytechnique Béranger. Paris et Liège, 1947.
(3) Deux (G.). — Le rôle de l'oxygène et des substances réductrices en brasserie. *Bulletin de l'Association des Chimistes*, avril-juin 1945, nº 4-6, p. 111-134.
(3 *bis*) Braems (J.). — Étude physique de l'aération de la bière au cours du soutirage. IIe Congrès Intern. Industr. Ferment. Gand 1952, p. 183-193.
(4) Rentschler (H.) et Tanner (H.). — Der Polarograph als Hilfsmittel für Getränkeanalysen. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung, mars 1953, 96, fasc. 3, p. 162-168.
(5) Warcollier et Le Moal. — Dosage de l'acide sulfureux dans les moûts de pommes et dans les cidres. *Ann. Falsif. et Fraudes*, juin 1929, nº 246.
(6) Bogdanski (K.). — Le mécanisme de l'action de l'acide ascorbique dans le jus de pommes. Les Fruits et leurs Dérivés, nº 21, p. 19.
(7) Dupaigne (P.) et Bogdanski (K.). — La mesure pratique de l'activité des polyphénoloxydases. *Industr. Agric. Alim.*, août-oct. 1950, LXVII, p. 387-392.
(8) Peterson (R. W.) et Walton (J. H.). — Autoxydation of ascorbic-acid *J. Am. Chem. Soc.*, 1943, **65**, p. 1212.
(9) Dekker (A. A.) et Dickinson (R. G.). — Oxydation of ascorbic acid by oxygen with cupric ion as catalyst. *J. Am. Chem. Soc.*, 1940, **62**, p. 2165-2171.

RECHERCHES SUR LA MATURATION DES VINS DOUX NATURELS

I. — INFLUENCE DU TRAITEMENT THERMIQUE PROLONGÉ A L'ABRI DE L'AIR

PAR

Léonce DEIBNER et Pierre BENARD

Station centrale de Recherches sur l'Œnologie, la Cidrerie et les Jus de Fruits, Narbonne

---

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Généralités.

II. — Rappel des travaux antérieurs.

III. — Recherches personnelles.

1° Objet et importance de ces recherches.
2° Mode opératoire.
a) Technique du chauffage.
b) Contrôle de l'opération.
3° Résultats obtenus.
a) Vins doux naturels rouges.
b) Vins doux naturels rosés.
c) Vins doux naturels blancs.
4° Discussion des résultats.

IV. — Conclusion.

Bibliographie.

I. — GÉNÉRALITÉS

Le traitement thermique constitue un des plus anciens procédés du traitement des vins, utilisés pour l'amélioration de leurs indices organoleptiques.

L'élévation de la température accélère dans le vin une série de réactions chimiques qui dans les conditions naturelles s'effectuent plus lentement.

Le chauffage des vins était déjà employé du temps des Anciens pour les faire vieillir plus promptement. Cette ancienne pratique a été utilisée par APPERT en 1804, comme moyen de conserver les vins. Ce traitement particulier, connu actuellement sous le nom de « pasteurisation », cherche

à détruire préventivement les germes microbiens nuisibles à la conservation des vins. En effet, PASTEUR a montré les bienfaits que l'on peut retirer de l'action de la chaleur (1). Si ces deux modes de traitement thermique font appel aux mêmes appareils, ils se différencient au point de vue des températures et de la durée des opérations. L'étude de la stérilisation par la chaleur a été faite dans différents traités (2). On trouvera l'historique du traitement thermique des vins dans les ouvrages de CAZALIS (3 *a*) et de SÉBASTIAN (3 *b*).

Le traitement thermique peut se faire soit par l'exposition au soleil, pratique bien ancienne, soit à l'aide d'appareils spéciaux. OTTAVI (*op. cit.* (3 *a*), p. 205) a constaté l'amélioration de la qualité des vins soumis à l'action de la lumière solaire dans les récipients fermés ; la température observée était de l'ordre de + 55°C ; cinq ou six jours d'exposition au soleil suffisent pour obtenir l'amélioration des vins. Le chauffage du vin en bouteilles à l'aide d'étuves ou de bains-marie permet d'obtenir une marche plus régulière de l'opération ; on ne dépasse pas, en général, + 65°C ; la durée du séjour du vin à cette température est de quelques minutes. Il existe, d'autre part, des procédés de chauffage, soit pour l'exposition au soleil, soit dans des locaux spéciaux, des vins placés dans les récipients non complètement remplis (*op. cit.* (2 *c*), p. 459) (4).

Il ressort de tout ce qui précède, que le traitement thermique peut s'effectuer soit en présence de l'air, soit en son absence. Pour mieux délimiter deux techniques bien différentes, GUERASSIMOV et POLITOVA-SOVZENKO (5) ont proposé de réserver au premier mode de traitement le terme « madérisation » en raison du rôle de l'oxygène de l'air ; le traitement à l'abri de l'air correspond à des processus tout à fait différents par rapport aux premiers, et caractérisés par la baisse du potentiel d'oxydo-réduction.

La pasteurisation des vins de table a été expérimentée systématiquement en France, à la suite de travaux de PASTEUR (*op. cit.* (1)), par GAYON (6*a*, *b*), LABORDE (6*c*) ; l'exposé des recherches se trouve dans ces différents ouvrages (*op. cit.* (2)). Les œnologues soviétiques, comme GUERASSIMOV et SESSIASCHVILI (7), OUNGOURIAN (8), FROLOV-BAGREEV et LOZA (9) ont également effectué des recherches dans ce sens.

En particulier, la madérisation des vins de dessert alcoolisés a fait l'objet de nombreux travaux soviétiques (10).

Le traitement thermique de ces mêmes vins à l'abri de l'air, comparativement avec la madérisation, a été étudié tout particulièrement par GUERASSIMOV et POLITOVA-SOVZENKO (11). Egalement, en Amérique du Nord, la fabrication des vins de « California, type Sherry » s'effectue par le chauffage des vins blancs à + 66°C pendant quelques mois en présence de l'air (12).

Les résultats de toutes ces recherches, brièvement énumérés, dé-

montrent l'importance du traitement thermique dans l'amélioration des vins de différents types. En particulier, le traitement thermique prolongé des vins de dessert alcoolisés, à l'abri de l'air, présente un intérêt considérable par sa nouveauté et par la possibilité de son application pratique.

Le présent mémoire est destiné à mettre en relief les résultats obtenus au cours de l'application de cette technique aux Vins Doux Naturels.

II. — RAPPEL DES TRAVAUX ANTÉRIEURS

Le nombre de travaux concernant le traitement thermique prolongé, à l'abri de l'air, des vins de dessert alcoolisés est extrêmement restreint.

GUERASSIMOV et OCHREMENKO (*op. cit.* (10*b*)) ont constaté lors de leur étude sur la madérisation des vins, dans les fûts, par exposition au soleil ou par chauffage dans des locaux spéciaux, que les vins de type Porto, les vins doux alcoolisés doivent être traités à l'abri de l'air, dans des récipients bien remplis.

Des recherches systématiques et très importantes sur l'influence du traitement thermique des vins de dessert, en présence de l'air ou en son absence, ont été effectuées par GUERASSIMOV et POLITOVA-SOVZENKO (*op. cit.* (5)). Les meilleurs résultats pour les vins de dessert du type Porto ont été obtenus après le traitement thermique à l'abri de l'air, aux températures de 40°-70°C. Les vins ainsi traités sont devenus plus aromatiques, plus harmonieux par rapport à ceux obtenus dans les conditions d'aération. Quant aux délais du chauffage, ils dépendent de la température utilisée ; à 70°C, il suffit de cinq jours pour qu'un vin jeune, non formé, acquière les caractéristiques recherchées d'un vin de dessert ; les mêmes résultats sont constatés au bout de 10-12 jours, si l'on fait appel à la température de 40°-45°C. D'une façon générale, le chauffage lent, aux températures suffisamment basses, permet d'obtenir, comme, d'ailleurs, dans le cas de la madérisation, les vins de qualité supérieure.

Les essais, effectués par GUERASSIMOV et POLITOVA-SOVZENKO, comprenaient surtout l'emploi d'une température élevée de l'ordre de 60°C. En général, les vins ont été chauffés dans des bouteilles de champagne, préalablement remplies de gaz carbonique, obturées de manière à laisser un petit espace libre au-dessus de la surface du vin. Les essais ont porté sur un vin contenant 19,6 p. 100 d'alcool en volume et 3 p. 100 de sucre. Au bout de 2-3 jours de chauffage, ce vin est devenu plus souple, plus harmonieux ; le goût propre aux vins de dessert est apparu à la 10e journée du traitement ; après 25 jours le vin acquiert le goût caractéristique des vins du type Porto. Au 60e jour le vin était nettement vieilli, avec une apparition, légère et agréable, de caramélisation.

Quant aux modifications chimiques, survenues au cours du chauffage, le tableau I résume les résultats obtenus.

TABLEAU I

Variation de la composition chimique des vins au cours du traitement thermique à l'abri de l'air

N° des eesais	Durée du chauffage	Alcool % volume	Aldéhydes mg/l	Acétals mg/l	Esters volatils %	Tanins g/l	Intensité de la couleur	Observations
1	Contrôle	19,63	99,7	18,9	0,55	0,59	1	
2	17 heures	19,63	102,8	18,9	0,36	0,59	1,04	
3	2 jours	19,65	102,8	18,9	0,52	0,53	1,04	
4	7 »	19,61	114,0	23,6	0,53	0,44	1,22	
5	14 »	19,68	108,0	24,3	0,55	0,44	1,31	filtration
6	21 »	19,63	109,8	26,0	0,57	0,40	1,39	»
7	28 »	19,63	116,0	31,3	0,58	0,31	1,66	»
8	42 »	19,60	92,0	—	0,54	—	1,18	»
9	60 »	19,63	89,9	—	0,54	—	1,18	»

Il est facile de constater la diminution sensible des substances tanniques et les variations de l'intensité de la couleur. Par contre, les variations des teneurs en acétaldéhyde, en esters sont minimes ; les acétals sont en augmentation quoique au début les changements ne soient pas considérables.

Il est possible également, comme l'ont démontré GUERASSIMOV et POLITOVA-SOVZENKO, d'obtenir la démadérisation des vins en les chauffant à l'abri de l'air dans un thermostat à 65-70° pendant 15 jours. Les vins traités sont devenus plus colorés, ont perdu sensiblement leur goût de madère de sorte que leurs caractéristiques organoleptiques correspondaient à celles d'un vin vieux du type Porto. Par contre, la quantité des aldéhydes et des acétals a varié très peu. Nous ignorons le type de Madère utilisé, sec ou doux. Or, cette circonstance est importante puisque KARAPETIAN et OGANDJANIAN (13) ont montré que les vins du type JEREZ, enrichis en acétaldéhyde jusqu'à 500 mg par litre, et soumis ensuite au chauffage à 45°C à l'abri de l'air, pendant quelques jours (de 7 à 17) sont le siège de la réaction de l'acétalisation intense.

Tout récemment POLITOVA-SOVZENKO (*op. cit.* (11*a*)) a publié les conclusions de ses essais complémentaires sur l'influence du traitement thermique, en présence de l'air et en son absence, sur la composition du vin. Il ressort des résultats obtenus que la durée du traitement et la régulation de l'admission de l'oxygène de l'air jouent un rôle important. Par la modification du régime thermique le même vin initial est susceptible de donner une gamme de produits possédant des bouquets différents. Les essais du chauffage à 60°C comprenaient l'examen organoleptique, les analyses chimiques et les mesures du potentiel d'oxydo-réduction suivant le schéma indiqué dans le travail mentionné tout à l'heure (*op. cit.* (5)).

Le vin expérimenté contenait 18,8 p. 100 d'alcool, 3,1 p. 100 de sucre, 4,8 g par litre d'acidité titrable, 1,14 g par litre de substances tanniques et colorantes.

Voici les résultats de l'examen organoleptique de ce vin, chauffé à 60°C, à l'abri de l'air, en fonction de la durée du chauffage :

TABLEAU II

Durée du chauffage en jours	Caractéristique générale
Témoin	Vin brut, non harmonieux
5 jours	Vin du type Porto madérisé
10 jours ...	Vin du type Porto madérisé
20 jours ...	Vin vieux, harmonieux, goût madérisé disparu
60 jours ...	Vin sans goût fruité.

Quant aux données analytiques, nous reproduirons seulement celles concernant le vin témoin et les vins chauffés en absence d'oxygène et en présence de 12 mg par litre, pendant 60 jours.

TABLEAU III

Indices		Témoin	Variante 1 $O_2 = 0$	Variante 2 $O_2 = 12$ mg/l
Alcool (degré % volume)		18,8	18,7	18,5
Aldéhydes	mg/l	37,8	28,2	40,4
Acétals	mg/l	21,2	28,9	29,0
Esters neutres	mg/l	404,8	598,4	686,4
Acides volatils	mg/l	900,0	810,0	810,0
Somme des substances tanniques et colorantes	mg/l	790,0	800,0	450,0
Azote total	mg/l	172	164	162,0

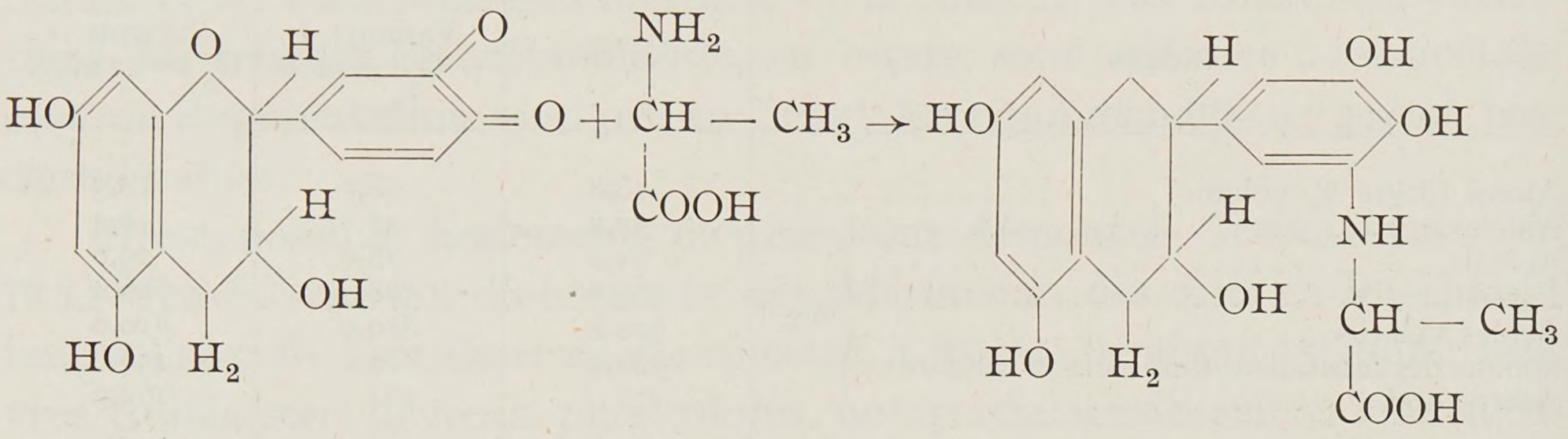
Les variations du potentiel d'oxydo-réduction étaient les suivantes : pour la variante 1, de 355 mV à 296 mV ; pour la variante 2, de 372 mV à 270 mV ; on remarque la formation des esters neutres, des aldéhydes et des acétals surtout en présence d'oxygène ; les substances tanniques et colorantes éprouvent dans ce cas une grande modification. Leur oxydation est responsable partiellement du changement de couleur comme, d'ailleurs, les processus de caramélisation. Toutefois, la présence des mélanoïdines, produits colorés en brun, influe également. Ces produits, comme l'ont démontré MAILLARD en 1912 (14*a*) et plus tard, KOSTYTCHEV et BRILLANT (14*b*) se forment très rapidement, à des températures plus ou moins élevées, à la suite de l'action des aminoacides ou des protéines sur les sucres réducteurs. On sait actuellement que cette réaction s'effectue différemment en fonction de la température et du pH du milieu.

KRETOVITCH et TOKAREVA (15) ont constaté que la formation des mélanoïdines et du gaz carbonique est accompagnée de celle des aldéhydes volatils. Nous avons signalé brièvement les résultats de ce travail dans une publication précédente (16). D'après ces auteurs, la réaction de MAILLARD implique des oxydo-réductions. PATRON (17) a émis l'hypothèse selon laquelle les substances aminées auraient comme principal rôle d'activer la molécule de sucre-réducteur. D'après GUERASSIMOV (18), la réaction

entre les aminoacides et les sucres-réducteurs se produit facilement dans les vins de dessert chauffés à l'abri de l'air. D'autre part, elle intervient dans le changement de couleur, dans la formation du bouquet des vins en raison de la présence des substances aromatiques, dans la modification du goût.

D'après AMERINE (19), la formation de l'hydroxyméthylfurfural, à partir de lévulose dans les vins doux chauffés contribue à l'amélioration de leur bouquet.

En se basant sur les travaux de POPOV et de KOURSANOV concernant la biochimie de la production du thé (20), FROLOV-BAGREEV et AGABALIANTZ (21) admettent la participation dans la formation du bouquet des produits de réaction entre les quinones et les aminoacides. KOURSANOV (*op. cit.* (20*a*), p. 37) donne le schéma suivant de la réaction entre l'alanine et le quinone formés à partir de la catéchine.



Il ressort de toutes ces considérations que le chauffage prolongé à l'abri de l'air des vins de dessert doux et alcoolisés provoque une série de réactions favorables à leur amélioration au point de vue du goût et du bouquet. D'après MAVEROFF (22), la conservation des vins blancs à la température de 30°-40°C pendant quelques jours produit un effet favorable, obtenu dans les conditions habituelles seulement au bout de quelques années. En outre, il est possible de prévenir les précipitations ferriphosphatiques dans les vins, préalablement débarrassés de leurs substances protéiniques à l'aide de terres adsorbantes, en les chauffant à 30°-40°C pendant 5-10 jours ; cette opération détermine la réduction du fer ferrique.

III. — RECHERCHES PERSONNELLES

1. — Objet et importance de ces recherches

Les vins doux naturels d'après la terminologie fiscale française, dont la production est assez localisée dans le midi de la France, occupent une place de choix dans l'économie française.

On sait que l'amélioration de la qualité des vins doux naturels cons-

titue le souci constant des milieux professionnels responsables. D'une façon générale, « les vins rouges de macération ne peuvent être avantageusement présentés au commerce qu'à partir de la quatrième année alors que les blancs ou les rosés ont acquis le caractère de vieux dès la fin de la deuxième année ; ces derniers sont « rancio » dès la troisième année tandis que les « premiers ne le deviennent qu'à partir de la cinquième » (23). Or, le stockage pendant plusieurs années est coûteux en raison de l'immobilisation du capital et de la consume. Cette circonstance favorise assez souvent l'offre à la consommation des vins insuffisamment vieillis. La commercialisation des vins doux naturels plus rapide serait possible, si leur maturation pouvait être accélérée à l'aide d'un procédé simple, relativement peu coûteux.

D'après AMERINE (24), les procédés du vieillissement accéléré des vins de dessert sont actuellement peu développés en raison des conditions économiques peu favorables à l'industrie de ces vins, leur imitation étant beaucoup plus aisée que celle des vins de table. AMERINE attribue cette particularité à peu d'influence du cépage sur les caractères des vins de dessert. En partie, cela est dû au rôle des teneurs élevées en alcool et en sucre de ces vins. TROOST admet qu'une très haute teneur en sucre semble couvrir les bouquets du raisin (25). Le traitement thermique des vins à l'abri de l'air permet aux vins d'acquérir non seulement le goût et l'odeur recherchés, mais également l'âge organoleptique bien avancé par rapport à celui du vin initial. Ce procédé constitue actuellement, d'après GUERASSIMOV, le moyen le plus efficace d'accélérer la maturation des vins spéciaux (26).

Nous avons choisi pour le traitement thermique prolongé, à l'abri de l'air, des vins doux naturels, l'échelle des températures étant comprises entre 40° et 45°C.

Cette échelle, proposée entre autres par GUERASSIMOV et POLITOVA-SOVZENKO (*op. cit.* (5)), n'a pas été encore expérimentée suffisamment en raison de la préférence de ces chercheurs pour les températures plus élevées, de l'ordre de 60°C.

Nous avons cherché à vérifier l'efficacité de la technique mentionnée sur les vins doux naturels jeunes, rouges et blancs, seuls ou mélangés. Les essais d'orientation ont été effectués dans les conditions du laboratoire suivant un mode opératoire bien déterminé.

2. — Mode opératoire

a) Technique du chauffage

Les vins, placés dans les bouteilles de 350 ml à 1 000 ml de capacité, préalablement remplies de gaz carbonique, ont été chauffés dans une étuve de laboratoire. D'une façon générale, on disposait les bouteilles debout

autour d'une bouteille centrale, remplie d'un vin du même type ; le bouchon de cette bouteille était muni d'un thermomètre à tige longue, préalablement introduit dans le trou d'aération de l'étuve chauffée à l'électricité. Les bouteilles de petite capacité pouvaient être disposées horizontalement ; toutefois, il faut éviter le contact du vin avec le bouchon en liège ; la position verticale des récipients est préférable. Nous avons constaté que le décalage entre la température de l'étuve et celle de la bouteille centrale n'excédait pas 4°-5°C. D'après MALVEZIN (*op. cit.* (2), p. 211), on admet que le vin dans la bouteille a trois degrés de moins par rapport à la température de l'autoclave. La température du chauffage ne descendait jamais au-dessous de 40°C et ne dépassait pas 45°C. La période d'induction de 24 heures et la période de refroidissement n'entraient pas en ligne de compte pour la durée du chauffage.

b) Contrôle de l'opération

Si l'analyse chimique fournit des indications fort utiles sur le vin, en particulier, sur sa structure, sur son état sanitaire, elle est impuissante à renseigner sur son arôme, son bouquet, son goût, qui intéressent au plus haut point le consommateur. Le désir de chiffrer les particularités de la composition du vin ne doit pas faire oublier que le vin est fait pour être bu et que ce qui compte dans l'appréciation de cette boisson, c'est la satisfaction que l'on éprouve à la goûter. Dans ces conditions l'analyse chimique renoncera toujours à se prononcer sur les qualités intimes du vin. C'est l'examen organoleptique qui remédie à cette carence de l'analyse, puisqu'il constitue le moyen le plus simple et le plus rapide pour juger l'efficacité des traitements que l'on fait subir au vin au point de vue de sa stabilisation ou de son amélioration.

Ce point de vue a été exposé tout récemment dans un important travail d'AMERINE et de ROESSLER (27). Lors de nos recherches d'orientation, nous avons réservé à l'examen organoleptique un rôle décisif. D'ailleurs, comme on le verra plus tard, les quelques déterminations analytiques, effectuées au cours de nos essais, ne reflètent pas les changements survenus dus à la formation des corps sapides ou odorants, présents soit en doses qui échappent à la sensibilité des méthodes employées, soit ce qui est important, sous formes diverses encore peu connues, pour lesquelles les moyens d'investigation ne sont pas encore mis au point. Bien entendu, cet état actuel de choses n'exclue nullement la nécessité de chercher les voies permettant l'évaluation de l'influence du traitement thermique sur les qualités organoleptiques des vins.

Au cours de nos essais les appréciations organoleptiques des vins ont été faites par plusieurs personnes suivant les modalités habituelles, sans faire appel aux procédés donnant lieu à l'application de la méthode sta-

tistique comme l'ont fait, d'une part, HEITZ, ROESSLER, AMERINE et BAKER (28*a*) et, d'autre part, BAKER et AMERINE (28*b*). En effet, nos expériences avaient seulement pour but d'obtenir des renseignements préliminaires sur l'efficacité du procédé choisi du traitement thermique des vins doux naturels.

Aussi souvent que cela a été nécessaire, on évaluait dans les vins un certain nombre de leurs composants. L'alcool a été dosé par distillation et densimétrie suivant la méthode officielle (29). Soulignons que pour les petites quantités de vin la méthode chimique de SEMICHON et FLANZY (30) est tout indiquée.

Les sucres réducteurs ont été dosés par méthode densimétrique dans le résidu de distillation, en employant les tables de DUJARDIN-SALLERON, « richesse en sucre du moût de raisin non fermenté » ; l'acidité volatile d'après le procédé de JAULMES avec l'utilisation du petit appareil de JAULMES (*op. cit.* (29), pp. 387-389) ; on dosait l'acidité de titration en présence du phénolsulfonaphtaléine suivant la technique de GILLE (31) (*cf. op. cit.* (29), p. 281). On sait que les teneurs en aldéhydes et en acétals, caractérisant le degré de l'oxydation du vin, constituent un des indices propres à chaque type de vin.

L'évaluation quantitative des aldéhydes s'effectuait suivant JAULMES et ESPEZEL (32). Quant au dosage des acétals, il a été fait à l'aide du procédé de RIBÉREAU-GAYON et de PEYNAUD (33) malgré ses inconvénients importants. Pour différentes raisons, nous n'avons pas pu utiliser les méthodes modernes bien étudiées de ce dosage.

La méthode iodométrique d'AGABALIANTZ et SAVENKOVA (34), décrite dans l'ouvrage de FROLOV-BAGREEV et AGABALIANTZ (*op. cit.* (21), p. 317) a été critiquée et modifiée tout récemment par KOULNEVITCH (35). Remarquons que les auteurs cités emploient pour la séparation de l'aldéhyde libéré les appareils distillatoires du type de celui de FRIEDEMANN, COTONIO et SHAFFER (36) contrairement à d'autres auteurs mentionnés et aussi à MARECA CORTÉS et CAMPOS SALCEDO (37) qui utilisent la simple distillation.

Quelques dosages de fer total ont été effectués suivant les procédés mis au point par l'un de nous et BOUZIGUES (38).

Les mesures du pH et du potentiel d'oxydo-réduction étaient exécutées à l'aide du potentiomètre des Établissements QUERÉ à Bordeaux, suivant le mode opératoire établi par l'un de nous (39), en présence du gaz carbonique.

Soulignons que les potentiels, mesurés en présence de l'électrode au calomel saturé, étaient toujours rapportés à l'électrode normale d'hydrogène. Malgré toute l'importance de la régulation d'admission de l'oxygène de l'air au cours du traitement thermique, nous n'avons pas pu effectuer, en raison des circonstances diverses, l'évaluation des indices

d'oxygène dissous et des peroxydes pour les vins expérimentés. D'ailleurs, les meilleures méthodes colorimétriques modernes, mises au point par les œnochimistes russes, ne sont pas applicables aux vins rouges ; quant aux procédés polarographiques, ils ne nous sont pas encore accessibles.

Signalons, enfin, pour conclure, l'impossibilité de suivre analytiquement les modifications des substances polyphénoliques et formation des substances chimiques issues de la réaction de MAILLARD. Or, c'est dans ces domaines qu'il aurait fallu chercher les changements responsables de l'amélioration des vins doux naturels soumis au traitement thermique utilisé par nous.

3. — **Résultats obtenus**

Les essais du traitement thermique prolongé, à l'abri de l'air, toujours à des températures comprises entre 40° et 45°C, ont porté sur les vins doux naturels rouges, rosés et enfin, blancs.

a) **Vins doux naturels rouges**

Les vins doux naturels rouges expérimentés ont été vinifiés à la propriété à partir du moût de raisin Grenache rouge. Les résultats obtenus avec un vin de Grenache rouge de Tautavel ont été fort intéressants, ce que montre le tableau IV.

TABLEAU IV

V. D. N. Grenache rouge, récolte 1952 (*Tautavel* (*P. O.*))
volume du vin traité — 400 ml

Durée du traitement en jours	Date du début	Dégustation — Mars 1953		
		Classement	Age apparent par rapport au témoin années	Observations
Témoin	—	3	—	vin jeune
10.....	6/2/53	2	+ 1	vin vieux
15.....	6/2/55	1	+ 2	vin vieux, bien différent du témoin.

La différence entre le témoin et les échantillons chauffés était telle que l'on pouvait parler de vins tout à fait différents, de l'avis des dégustateurs professionnels. Le goût de vin vieux et l'âge organoleptique de 2 ans attribué à l'échantillon, soumis au chauffage pendant 15 jours, constituent la meilleure preuve de l'efficacité du traitement employé.

La même constatation s'appliquait au vin Grenache rouge en prove-

nance de Villeneuve-les-Corbières. Le traitement a apporté également une très nette amélioration dans la valeur gustative des vins chauffés par rapport au témoin. L'âge organoleptique des vins traités était en avance d'un an par rapport au témoin. Le tableau V résume les conclusions des différentes dégustations.

TABLEAU V

V. D. N. Grenache rouge, récolte 1952 (Villeneuve-les-Corbières (Aude))
volume du vin traité — 700 ml

Traitement durée en jours	Date de début	Dégustation 3/2/53		Dégustation Mars 1953		Dégustation 4/12/54		Dégustation 6/4/54	
		Classement	Observations	Classement	Age apparent par rapport au témoin années	Classement	Observations	Classement	Observations
Témoin	—	3	vin jeune, goût d'alcool	2	—	2	vin jeune	3	goût d'alcool astringent, couleur d'un vin vieux
10	6/2/53	2	bon vin, plus vieux	1	1	+ 1	plus âgé, plus fait, bouquet prononcé,	2	plus vieux, goût d'alcool disparu
15	»	1	plus fruité, harmonieux	1	1	+ 1	moins doux	1	vin vieux, couleur vive

Soulignons, en particulier, l'apparition du goût recherché à la fin du traitement. Quant aux résultats analytiques obtenus et consignés dans le tableau VI, ils ne nous permettent pas, bien entendu, de faire des conclusions sur la nature des changements survenus. Les acétals n'ont pas été décelés. La baisse du potentiel d'oxydo-réduction a été sensible. A titre de comparaison, nous avons soumis un vin rouge sec jeune des Corbières, au chauffage pendant 16 jours. Si l'examen organoleptique a permis de constater un changement très perceptible, l'assouplissement

TABLEAU VI

Données analytiques
V. D. N. Grenache rouge, récolte 1952 (Villeneuve-les-Corbières (Aude))

Vin traité (durée en jours)	Alcool % vol.	Sucre g/litre	Acidité H_2SO_4 g/litre		Acétaldéhyde mg/litre	Mesures potentiométriques			
			Volatile	Totale		Date	T°	pH	E_H mV
Témoin.....	15,3	114	0,30	3,90	62,2	5/4/54	19	3,12	+ 340
10 jours	—	—	0,30	3,90	58,08	7/4/54	20	3,15	+ 255
15 jours	—	—	0,30	3,80	59,8	6/4/54	19	3,12	+ 235

constaté laissait à désirer. Cette constatation souligne une fois de plus le rôle de la composition des vins doux naturels sur l'évolution des caractères au cours du traitement thermique.

b) Vins doux naturels rosés

Les vins doux naturels rosés ont été vinifiés au laboratoire à partir du moût obtenu par le mélange, en parties égales, des jus de Grenache rouge et de Macabéo. L'alcoolisation à 10 p. 100 a été effectuée à l'aide d'une eau-de-vie de raisin par deux procédés : par l'affusion graduelle en trois fois et par la diffusion des vapeurs alcooliques suivant notre procédé (40). Soulignons que presque simultanément GRIASNOV (41) a publié un travail proposant le même mode opératoire avec l'emploi d'un appareil spécial de laboratoire. Le principe du procédé dit « diffusion d'alcool en phase vapeur » en circuit fermé et à la température ordinaire, a été énoncé pour la première fois par PRANDI en 1924 (42) et ensuite par PROSTOSSERDOV (43) ; les recherches sur la diffusion d'alcool en phase vapeur ont été faites par PROSTOSSERDOV et KOSTONIAN (44).

Cette série de nos essais comprenait la comparaison d'un échantillon du vin alcoolisé en phase vapeur et chauffé pendant 10 jours aux témoins constitués par un échantillon alcoolisé par affusion en trois fois et par un autre alcoolisé en phase vapeur.

Le tableau VII contient les résultats obtenus.

TABLEAU VII

Vin doux naturel rosé, récolte 1952 — volume du vin traité : 370 ml

Traitement (durée en jours)	Date début de traitement	Dégustation 9/12/52		Dégustation 2/12/53	
		Observations	Note sur 20	Classement	Observations
Témoins : *a*) alcoolisation par 3 affusions . . .	—	couleur saumon, goût normal, vineux ; arôme d'un vin jeune.	9	3	bon vin.
b) alcoolisation en vapeur	—	plus coloré, saveur grenache prononcée, fin, fruité.	14	2	bon vin, fruité, fin.
Vin alcoolisé en vapeur, chauffé 10 jours	26/XI/55	couleur jaune foncé, saveur accentuée, rancio, plus sec, plus vieux, plus fruité.	16	1	plus alcoolisé, plus fruité, meilleur vin.

Il ressort des résultats que l'alcoolisation en phase vapeur donne déjà un produit fruité et plus fin par rapport au témoin (*a*) ; toutefois, le chauffage améliore sensiblement sa qualité.

Quelques résultats analytiques sont consignés dans le tableau VIII. On a observé l'absence d'acétals et la fixité de la teneur en acétaldéhyde.

TABLEAU VIII

Vin doux naturel rosé, récolte 1952. — Données analytiques

Vins	Alcool % volume	Sucre g/l	Acidité H_2SO_4 g/l		Acétaldéhyde mg/l	Fer total mg/l
			Volatile	Totale		
Témoin.....	16,3	124	0,35	2,80	45,7	12,6
Vin chauffé 10 jours.....	—	—	—	—	45,7	—

c) Vins doux naturels blancs

Les vins doux naturels blancs ont été vinifiés à la propriété à partir d'un moût de Grenache blanc.

Les premiers essais ont porté sur un vin de Tuchan (Aude). Aussitôt après le traitement thermique, la comparaison des vins, au point de vue dégustatif, a montré qu'ils étaient déjà différenciés ; cette constatation a conservé sa valeur lors d'un examen ultérieur. Le fait intéressant, le chauffage pendant 10 jours a paru, dans les conditions de nos expériences, suffisamment efficace quant au maximum de l'amélioration.

Les résultats des dégustations sont consignés dans le tableau IX. Il ressort de ces résultats qu'au bout d'un an le témoin paraissait, malgré sa bonification, jeune avec goût d'alcool ; le chauffage assouplit le vin, fait fondre l'alcool « plus facilement ».

TABLEAU IX

V. D. N. Grenache blanc, récolte 1952 (Tuchan (Aude))
volume du vin traité : 1 000 ml

Traitement, durée en jours	Date de début	Dégustation 21/6/53		Dégustation 22/6/53		Dégustation 22/6/54	
		Classement	Observations	Classement	Observations	Classement	Observations
Témoin	—	2	vin jeune, goût d'alcool.	3	goût d'alcool jeune.	3	paraît plus jeune, goût d'alcool.
10	6/2/53	—	—	1	plus vieux, goût d'alcool moindre, meilleur vin.	1	plus souple, plus vieux, meilleur.
15	«	1	plus souple, plus vieux, rancio.	2	vin vieux.	2	vin vieux, goût de rancio.

L'analyse chimique n'a pas révélé la présence des acétals ; aucun changement pour l'acétaldéhyde. Les valeurs du potentiel d'oxydo-réduction sont voisines, comme le montre le tableau X.

TABLEAU X

Données analytiques
V. D. N., Grenache blanc, récolte 1952 (Tuchan (Aude))

Durée de traitement en jours	Alcool % volume	Sucre g/l	Acétaldéhyde mg/l	Acétals en acétaldéhyde mg/l	Mesures potentiométriques			
					Date	T°	pH	E mV
Témoin	16,9	62,9	29,5	néant	21/6/54	26,5	3,62	+ 226
10 jours	—	—	—	»	22/6/54	24	»	+ 206
15 jours	—	—	29,5	»	21/6/54	28	»	+ 213

Ensuite nous avons étudié comparativement le comportement des vins en provenance d'Estagel (P. O.), issus de deux récoltes, 1951 et 1952. Au point de vue de leur composition chimique, ces vins sont presque identiques, comme on le constate par les résultats analytiques donnés dans le tableau XI. Contrairement au vin de Tuchan, le chauffage pendant 10 jours n'a pas produit un effet sensible sur l'amélioration des qualités gustatives de ces vins.

TABLEAU XI

Vin blanc Estagel (P. O.). — Données analytiques

Déterminations analytiques	Résultats	
	Récolte 1951	Récolte 1952
Degré % volume	16,1	15,8
Sucre g/litre	97	101
Acidité totale (en H_2SO_4 g/l)	3,4	3,3
Acidité volatile »	0,3	0,35
Fer mg/litre	14,4	18,6

Pour le vin de récolte 1951 le chauffage prolongé au maximum (21 jours) était plus favorable, tandis que pour celui de la récolte 1952, la durée de 15 jours paraissait suffisante. Ces impressions ont conservé leur valeur au bout de 19 mois après le premier examen organoleptique (voir le tableau XII). Toutefois, il est apparu que l'effet améliorant du chauffage sur la qualité de ces vins n'était pas aussi sensible par rapport aux vins expérimentés précédemment. Par exemple, les vins de la série de l'année 1952 paraissent dans l'ensemble bons au point de vue du goût et de l'odeur. Bien entendu, une différence nette existe sans être bien décisive.

Tableau XII

V. D. N. Grenache blanc (Estagel (P. O.))
Début de traitement le 4 mars 1953. Volume du vin traité : 1 l

Traitement durée en jours	Dégustation 27/3/53		Dégustation 17/11/54	
	Classement	Observations	Classement	Observations
Récolte 1951				
a) Témoin	3	peu de différence, goût d'alcool.	4	goût d'alcool, paraît plus trapu.
b) 10 jours . . .	3		1	plus harmonieux.
c) 15 jours . . .	2	bon vin, harmonieux.	3	bon vin, picotement.
d) 21 jours . . .	1	meilleur vin.	2	bon vin, meilleur que le précédent.
Récolte 1952				
a) Témoin	3	goût d'alcool.	3	goût d'alcool, plus fruité, bon.
b) 10 jours . . .	2	peu de différence par rapport au témoin.	2	peu de différence par rapport au témoin.
c) 15 jours . . .	1	meilleur vin.	1	plus fin, légèrement rancio, plus fondu, plus souple.
d) 21 jours . . .	2	un peu meilleur par rapport au témoin.	4	ressemble au (*b*), moins généreux, moins souple que le précédent.

4. — Discussion des résultats obtenus

Les vins doux naturels rouges ou rosés, soumis au traitement thermique utilisé au cours de nos recherches, ont montré sans exception une forte aptitude à l'amélioration de leurs qualités organoleptiques. Par contre parmi les vins blancs, nous avons rencontré quelques-uns plus ou moins réfractaires à l'action améliorante de la chaleur. Sans doute, une température un peu plus élevée aurait été plus efficace dans ces cas particuliers. Il ressort de ces constatations que la nature des vins joue son rôle, ce qui pose le problème de la connaissance des particularités de cette nature. Au point de vue économique et technologique, le traitement thermique utilisé par nous ne pourrait être appliqué qu'aux produits susceptibles de se bonifier rapidement, d'acquérir sans tarder un autre âge organoleptique. Dans ces conditions, l'accélération de la maturation des vins doux naturels suppose leur sélection préalable, basée sur les essais préliminaires du traitement thermique choisi.

Il ressort des expériences effectuées que, dans le meilleur cas, l'âge organoleptique des vins traités correspond à deux années d'avance par rapport au témoin, ce qui constitue une amélioration fort intéressante.

Cette amélioration n'est imputable, dans les conditions de nos recherches, ni aux acétals, ni à l'acide dioxymaléique ; d'ailleurs, ce dernier est détruit déjà à + 20° — + 25°. La teneur en acétaldéhyde varie peu et apparemment cette substance n'interviendrait pas dans les changements des qualités des vins doux naturels chauffés à l'abri de l'air. Quant aux

cétones et aux autres aldéhydes, ils mériteraient être dosés, ce qui pose un problème analytique particulier, d'ailleurs, actuellement étudié, en ce qui concerne les aldéhydes, par JAULMES et DIEUZEIDE (*op. cit.* (32*c*), p. 62).

Il y a lieu de penser que les réactions responsables de l'amélioration des qualités des vins doux naturels chauffés s'effectuent au sein des substances polyphénoliques, des sucres réducteurs, des acides aminés et aussi des protéines. Ces modifications se font également dans les vins mentionnés, conservés dans les conditions habituelles, mais à des vitesses faibles.

Les réactions du type Maillard jouent un rôle important par la formation des pigments bruns, très réducteurs, des différentes substances volatiles ou fixes ; elles sont accompagnées, en général, d'un dégagement de gaz carbonique. Comme nous l'avons déjà vu, le mécanisme exact de ces réactions, la nature chimique des mélanoïdines ne sont pas connus avec certitude. Toutefois, on sait que l'oxygène augmente le taux de formation de ces substances surtout en présence du fer, tandis que l'anhydride sulfureux inhibe fortement ces réactions.

Le mécanisme de ces dernières et la nature chimique des substances formées, leur influence sur les propriétés organoleptiques des aliments constituent autant de problèmes à résoudre.

Le chauffage agit très favorablement dans la majorité des cas sur l'assimilation rapide de l'alcool de surforce additionné au cours de l'élaboration des vins doux naturels. Nous avons vu déjà dans une publication précédente (*op. cit.* (40)) l'effet favorable de l'introduction de cet alcool en phase vapeur. On sait que l'eau et l'alcool constituent des liquides associés, c'est-à-dire contenant des complexes moléculaires. L'eau, par exemple, est un mélange de trihydrol, de dihydrol et monohydrol, à + 15°C l'eau contient 5 p. 100, 90 p. 100 et 5 p. 100 de ces molécules respectivement (45). On admet que les molécules d'eau peuvent contracter des liaisons de type coordinatif avec d'autres molécules identiques par l'intermédiaire des liaisons hydrogène, par exemple, avec les groupements polaires des molécules diverses. C'est le cas des molécules d'alcool éthylique. Les molécules polaires de cet alcool forment des complexes en raison de l'attraction électrostatique. Lors de l'addition d'alcool au vin, la diffusion des molécules d'eau dans les complexes moléculaires d'alcool provoque la désagrégation de ces derniers, accompagnée d'absorption de chaleur ; en même temps, l'interaction chimique des molécules d'eau et d'alcool est accompagnée d'un dégagement de chaleur. La dissociation des complexes de ces liquides augmente et le volume total diminue. Or, les associations moléculaires d'alcool confèrent au liquide alcoolisé un goût plus ou moins dur (cf. *op. cit.* (41)). A une température plus élevée, de l'ordre de 40°-45°C, l'assimilation d'alcool est plus rapide en raison de l'interaction insignifiante entre les molécules, et du peu de stabilité des

associations moléculaires présentes. Il existe dans un vin alcoolisé un certain équilibre entre les molécules simples et les associations moléculaires, impossible, d'ailleurs, à chiffrer dans l'état actuel de nos connaissances.

Le traitement thermique utilisé par nous permet d'activer l'évolution naturelle des vins doux naturels, longue à obtenir dans les conditions habituelles, contribue à l'acquisition par le vin des qualités optima déjà inscrites en puissance avant son évolution. Bien entendu, les effets de cette opération varieront avec la composition du vin.

A l'aide du traitement thermique, l'évolution du vin peut être aidée, accélérée, sans qu'aucun élément étranger soit introduit dans son milieu.

Quant aux effets de ce traitement sur la valeur physiologique des vins doux naturels, nous ne pouvons, pour l'instant, rien en dire.

IV. — CONCLUSION

Le chauffage provoque dans les vins des changements d'ordre chimique déterminant la modification de leurs qualités organoleptiques. Ces changements dépendent de différentes conditions telles que l'absence ou la présence de l'oxygène, la température et la durée de l'opération.

En partant des travaux de GUERASSIMOV et POLITOVA-SOVZENKO, nous avons fait appel au traitement prolongé à l'abri de l'air, à la température de 40°-45°C, alors que ces auteurs opèrent à 60°C. Appliqué aux vins doux naturels, ce traitement est apparu comme un procédé effectif permettant d'améliorer sensiblement et dans un bref délai les qualités des produits jeunes, mal équilibrés, en leur conférant un âge organoleptique plus avancé par rapport au vin mis en œuvre.

Il est à noter que le chauffage des vins de dessert alcoolisés et, en particulier, des vins doux naturels, à l'abri de l'air, aux températures indiquées, pendant des périodes allant jusqu'à 21 jours, n'a pas, au moins à notre connaissance, de précédents en France ; de ce fait il constitue une innovation d'autant plus intéressante qu'elle apporte des résultats positifs et prometteurs au point de vue technique et économique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) PASTEUR (L.). — Études sur le vin, 204 et suite, 1873, Paris, Savy édit.
(2) *a*) MALVEZIN (F.). — Manuel de pasteurisation des vins, Paris, Tignol édit.
b) SEMICHON (L.). — Traité des maladies des vins, 475, 1901, Montpellier, Coulet édit.
c) VENTRE (J.). — Traité de vinification, **2**, 1929, Montpellier, Coulet édit.
d) MALVEZIN (P.) — Le Vin, 86, 1931, Bordeaux, Feret édit.
e) RIBÉRAU-GAYON (J.). — Traité d'Œnologie, 224, 415, 1950, Paris, Béranger édit.

f) GAROGLIO (P.). — Nuevo Trattato di Enologia, **2**, 884 et suite, 1953, Sansoni Edizioni Scient.

(3) *a*) CAZALIS (F.). — Traité pratique de l'art de faire le vin, 197, 1890, Montpellier-Paris, Coulet-Masson édit.

b) SÉBASTIAN (V.). — Les vins de luxe, 277, 1897, Paris-Montpellier, Masson et Coulet édit.

(4) SEMICHON (L.). — L'œnologie. Dix ans d'efforts scient. et ind. 1914-1924, 33, 1926, Paris, Ch. et Ind. édit.

(5) GUERASSIMOV (M.), POLITOVA-SOVZENKO (T.). — Traitement thermique des vins de dessert doux alcoolisés. *Biochimiya vinodéliya*, nº 3, 147, 1950, Moscou, Ac. Sci. S. S. S. R. édit.

(6) *a*) GAYON (U.). — Expérimentation sur la pasteurisation des vins de la Gironde. *Mémoires Soc. Sc. Phys.*, Bordeaux, **4**, 1894 ; *Rev. Vit.* **3**, 585, 1895 ; **19**, 673, 725, 1903. — Notes sur la vinification et sur la pasteurisation des vins, 1898, Bordeaux, Gounouilhou édit.

b) GAYON (U.), DUBOURG (E.). — Sur le vieillissement des vins en bouteilles, *Revue de Vit.*, **39**, 200, 1913.

c) LABORDE (J.). — Recherches sur la pasteurisation des vins. *Revue de Vit.*, **26**, 433, 481, 522, 1906.

(7) GUERASSIMOV (M.), SESSIASCHVILI, dans GUERASSIMOV (M.). — Maturation et vieillissement des vins, 1939, Moscou, Pischepromizdat édit.

(8) OUNGOURIAN (P.). — Essai du traitement thermique des vins. *Rec. travaux Labor. Œnochim. du Don*, S. S. S. R., 1931.

(9) FROLOV-BAGREEV (A.), LOZA (V.). — Sur la question du vieillissement du vin. *Vinodélié i Vinogradarstvo*, S. S. S. R. nº 1, 21, 1950.

(10) *a*) OUNGOURIAN (P.). — Principales modifications chimiques pendant la madérisation du vin. *Messager de l'Œnologie de l'Ukraine*, nº 5, 1927.

b) GUERASSIMOV (M.), OCHREMENKO (N.). — Matériaux pour l'étude de la question de la conservation des vins sous l'influence des rayons solaires. *Journal Jardin Bot. Jalta*, Crimée, **12**, nº 1, 1929.

c) FROLOV-BAGREEV (A.), OUNGOURIAN (P.). — Influence des enzymes sur le processus de la madérisation du vin. *Rec. Travaux Inst. Panuniste Rech. Sc. Vit. et Œnol.* **7**, 1937.

d) OUNGOURIAN (P.), KALOUGUINA (G.), ZOUEVA (E.). — Potentiel d'oxydoréduction au cours de la madérisation du vin. *Trav. Inst. Rech. Sc. Œnol. Vit.*, R. S. F. S. R., **7**, 1939.

e) OUNGOURIAN (P.). — Sur l'étude du mécanisme de la madérisation. *Vinodélié i Vinogradarstvo*, nº 11-12, 1940.

f) PAVLOV-GRISCHINE (S.). — Établissement du régime optimum au cours du traitement thermique des vins de raisin. *Vinodélié i Vinogradarstvo*, nº 3, 1940.

g) OUNGOURIAN (P.). — Sur le chimisme de la madérisation du vin. *Biochimiya vinodeliya*, nº 3, 102, 1950, Ac. Sc., S. S. S. R. édit.

(11) *a*) POLITOVA-SOVZENKO (T.). — Influence du traitement thermique sur la composition des vins. *Vinodélié i Vinogradarstvo*, S. S. S. R., nº 7, 8, 1954.

b) POLITOVA-SOVZENKO (T.). — Contrôle au cours du traitement thermique des vins. *Vinodélié i Vinogradarstvo*, S. S. S. R., nº 11, 56, 1951.

(12) JOSLYN (M.), AMERINE (M.). — Commercial production of dessert wines. *Bull. Agr. Exp. Station*, University of California, nº 651, 103, 1941.

(13) TER-KARAPETIAN (M.), OGANDJANIAN (A.). — Formation dirigée des acétals dans le vin au moyen du traitement thermique. *J. prik. Khimiï (J. Ch. Appl.)*, S. S. S. R., **26**, nº 2, 233, 1953.

(14) *a*) MAILLARD (L.). — Action des acides aminés sur les sucres ; formation des mélanoïdines par voie méthodique. *C. R. Ac. Sc. Fr.*, **154**, 66, 1912. — Réaction générale des acides aminés sur les sucres : ses conséquences biologiques. *C. R. Soc. Biol.*, 559, 1912.

b) KOSTYTCHEV (S.), BRILLANT (V.). — *J. Soc. Russe de Botanique*, **5**, 78, 1920.

(15) KRETOVITCH (V.), TOKAREVA (R.). — Interaction des aminoacides et des sucres aux températures élevées. *Biochimiya*, S. S. S. R., **13**, nº 6, 508, 1948.

(16) DEIBNER (L.). — Rôle du potentiel d'oxydo-réduction et de la nature de différents systèmes oxydo-réducteurs pendant les transformations et la maturation des vins. *Rev. Ferm. Ind. Agr.*, **8**, nº 1, 7, nº 2, 47, 1953.

(17) PATRON (A.). — Studies of the mechanisms involved in food darkening. Thèse, University of Massachusetts, 1949 ; *Fruits d'Outre-Mer*, **5**, 167, 201, 1950. — Les phénomènes d'oxydation dans la production et la conservation des jus de fruits. *Annales Inst. Fruits, Agrumes Coloniaux*, nº 7, 55, 1953.

(18) GUERASSIMOV (M.). — Influence des produits de l'interaction des aminoacides et des sucres sur le bouquet du vin. *Vinodélié i Vinogradatstvo*, S. S. S. R., nº 7, 9, 1952.

(19) AMERINE (M.). — *a*) Hydroxyméthylfurfural in California wines, *Food Res.*, **13**, nº 3, 264, 1948. — *b*) The response of wine to aging. *Wines and Vines*, **31**, nº 3, 19 ; nº 4, 71 ; nº 5, 28, 1950 (tiré à part, page 8).

(20) *a*) POPOV (V.). — Processus oxydatifs secondaires au cours de la fermentation du thé. *Biochimiya tchaïnogo proizvodsta* (Biochimie de la production du thé) nº 6, 124, 1950, Moscou, Ac. Sc. S. S. S. R. édit.

b) KOURSANOV (A.). — Synthèse et modifications des substances tanniques dans la plante à thé, 1952, Moscou, Ac. Sc. S. S. S. R. édit.

(21) FROLOV-BAGREEV (A.), AGABALIANTZ (G.). — Chimie du vin, 79, 1951, Moscou, Pischepromizdat édit.

(22) MAVEROFF (A.). — *Enologia*, 335, 406, 1949, Mendoza, Argentine.

(23) GOT (N.). — Les vins doux naturels, 89, 1947, Perpignan.

(24) AMERINE (M.). — Dessert Wine Production Problems of California grapes. *Wines and Vines*, **33**, nº 1, 15 ; nº 2, 29 ; nº 3, 24 ; nº 4, 59 ; nº 5, 21 ; 1952 (tiré à part, p. 1).

(25) TROOST (G.). — Modification du goût par la condition de la ferm. des vins blancs. *Weinberg und Keller*, août 1954 (d'après *Bull. Office Int. Vin*, **27**, sept. 173, 1954).

(26) GUERASSIMOV (M.). — Régimes du traitement thermique des vins. *Vinodélié i Vinogradarstvo*, nº 2, 8, 1955.

(27) AMERINE (M.), ROESSLER (E.). — Techniques and problems in the organoleptic examinations of wines. *Proc. Amer. Soc. Enol.*, 97, 1952.

(28) *a*) HEITZ (J.), ROESSLER (E.), AMERINE (M.), BAKER (G.). — A study of certain factors influencing the composition of California-type Sherry during baking. *Food Res.*, **16**, nº 3, 192, 1951.

b) BAKER (G.), AMERINE (M.). — Organoleptic ratings of wines estimated from analytical data. *Food Res.*, **18**, nº 4, 381, 1953.

(29) JAULMES (P.). — Analyse des vins, 53, 1951, Montpellier, Poulain édit.

(30) SEMICHON (L.), FLANZY (M.). — Dosage de l'alcool dans les vins et spiritueux par l'emploi du mélange sulfochromique. *Ann. Fals. Fraudes*, **22**; 139, 1929.

(31) GILLE (R.). — Méthode de dosage de l'acidité dans les milieux colorés, notamment dans les vins. *Ann. Fals. Fraudes*, **25**, 145, 1932.

(32) *a*) ESPEZEL (P.). — L'acétaldéhyde dans les vins et les spiritueux. *Thèse Pharmacie*, 1932, Montpellier.

b) JAULMES (P.), ESPEZEL (P.). — Le dosage de l'acétaldéhyde dans les vins et les spiritueux. *Ann. Fals. Fraudes*, **23**, 235, 1935.

c) JAULMES (P.). — Le dosage de l'acétaldéhyde et ses applications en analyse des vins et des spiritueux. Mises au point de chimie appliquée et d'analyse bromatologique, 1 série, 51, 1953, Paris, Masson édit.

(33) RIBÉREAU-GAYON (J.), PEYNAUD (E.). — Sur le dosage et la chimie de

l'éthanal et de ses combinaisons dans les vins et les alcools. *Ann. Inst. Pasteur*, **73**, 777, 1947. — Aldéhyde et ses combinaisons dans les vins et les alcools. *Revue Viti.*, **94**, n° 5, 133 ; n° 6, 177, 1948.

(34) AGABALIANTZ (G.), SAVENKOVA (O.). — Méthode iodométrique du dosage des acétaldéhydes. *Trav. Station Exp. Vit. Œnol. du Don,* S. S. S. R., **2**, 59, 1934.

(35) KOULNEVITCH (V.). — Détermination des aldéhydes et des acétals dans le vin. *Vinodélié i Vinogradarstvo,* S. S. S. R. n° 2, 17, 1955.

(36) FRIEDEMANN (T.), COTONIO (Mlle M.), SHAFFER (P.). — The determination of lactic acid. *J. Biol. Chem.*, **73**, 335, 1927.

(37) MARECA CORTÈS (I.), CAMPOS SALCEDO (M.). — Metodo para la determinacion de acetal en vinos, bebidas alcoholicas en general y soluciones analogas. *Annales R. Soc. Esp. Fis. Quimica*, **51**, n° 1, 85, 1955.

(38) DEIBNER (L.), BOUZIGUES (H.). — Dosage électrophotométrique des traces de fer total dans les vins à l'aide de l'ortophénanthroline. *Ann. Tech. Agr.* I. N. R. A., **1**, n° 3, 283, 1952. — Procédé rapide de traitement oxydatif des vins secs ou sucrés par voie humide à l'aide du peroxyde d'hydrogène ; son application au dosage électrophotométrique de traces de fer à l'aide de l'orthophénanthroline. *Ann. Techn. Agr.* I. N. R. A., **2**, n° 4, 389, 1953. — Dosage de traces de fer total dans les vins. *Mikrochimica Acta,* n° 5, 501, 1954.

(39) DEIBNER (L.). — Recherches sur les techniques de mesure du potentiel d'oxydo-réduction dans les jus de raisin et les vins. Détermination de ce potentiel dans quelques jus de raisin et quelques vins. *Ann. Techn. Agr.* I. N. R. A. *5*, n° 1, 31, 1956.

(40) DEIBNER (L.), BENARD (P.). — Nouveau procédé d'alcoolisation des vins spéciaux par diffusion graduelle des vapeurs alcooliques. *Ind. Agr. Alim.*, **69**, n° 12, 801, 1952.

(41) GRIASNOV (V.). — Procédé d'alcoolisation des vins par diffusion. *Vinodélié i Vinogradarstvo,* S. S. S. R., n° 5, 14, 1952.

(42) PRANDI (d'après MOGUILYANSKI (N.). — Acétification du vin, *Vinodélié i Vinogradarstvo,* n° 11-12, 19, 1940).

(43) PROSTOSSERDOV (N.). — Messager de la viticulture et du commerce du vin, S. S. S. R., n° 10, 687, 1930.

(44) PROSTOSSERDOV (N.), KOSTONIAN (V.) (d'après le renvoi (41) p. 15).

(45) BENEZECH (C.). — Quelques aspects de la Physiologie Gén. de l'Eau. *L'alim. et la vie,* **41**, n° 10-11-12, 199, 1953.

RECHERCHES SUR LA MATURATION DES VINS DOUX NATURELS

II. — ESSAI DE CATALYSEURS MÉTALLIQUES

PAR

Léonce DEIBNER et **Pierre BÉNARD**

Station centrale de Recherches sur l'Œnologie,
la Cidrerie et les Jus de Fruits, Narbonne

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Introduction.

II. — Rôle des quelques microéléments à valences multiples au cours de la maturation des vins.

III. — Recherches personnelles.

A. — Étude de l'influence des additions du manganèse en fonction de différents régimes thermiques.
a) Vins doux naturels rosés ;
b) vins doux naturels rouges ;
c) vins doux naturels blancs.

B. — Étude de l'influence des additions du manganèse et du molybdène en fonction de différents régimes thermiques.

C. — Discussion des résultats obtenus.

IV. — Conclusion.

Bibliographie.

I. — INTRODUCTION

La maturation des vins ne s'effectue pas suivant un schéma identique pour tous les types de vin. L'évolution des vins emprunte des voies différentes suivant leur origine, leur composition initiale, leurs états, en fonction de l'influence des facteurs divers. Parmi ces derniers la température constitue un facteur physique important ; en effet, elle accélère l'affinage du vin par son action sur la vitesse des transformations physico-chimiques et biochimiques ; à l'abri de l'air, elle détermine la diminution du potentiel d'oxydo-réduction. Pour que ces phénomènes d'oxydo-

réduction soient possibles, non seulement la présence des substances d'une nature déterminée est indispensable, mais également l'intervention des catalyseurs minéraux et organo-métalliques.

D'autre part, la vitesse de la maturation du vin, le sens de cette dernière sont en relation étroite avec le potentiel d'oxydo-réduction. Par l'augmentation ou par la diminution de ce potentiel il est possible de diriger le processus de maturation ; à chaque niveau du potentiel correspond l'apparition de substances déterminées ce qui permet d'obtenir des produits différents à partir d'un vin donné.

Ces remarques s'appliquent surtout aux vins de dessert et, en particulier, aux vins doux naturels.

Si la maturation de certains vins de table français est plus ou moins connue, par contre, la documentation correspondante est presque inexistante dans le cas des vins doux naturels, malgré leur renommée de produits de qualité.

Les recherches sur la régulation de la maturation de ces vins sont à peine à leur début, puisqu'un seul mémoire précédemment fait (1) est consacré uniquement à l'influence du traitement thermique, à l'abri de l'air, sur leurs qualités organoleptiques.

Or, l'étude de cette maturation gagnerait en ampleur et en signification scientifique, si l'activité des catalyseurs métalliques, seuls ou en liaison avec la température, pouvait être mise en évidence, conformément aux idées émises et aux conclusions des essais effectués à l'occasion de la maturation des vins d'autres types.

Le présent mémoire expose les résultats de recherches d'orientation effectuées en vue d'établir les conséquences, au point de vue des propriétés organoleptiques, de l'intervention des micro-éléments à valences multiples au cours de la maturation des vins doux naturels en fonction des différents régimes thermiques.

II. — ROLE DES QUELQUES MICROÉLÉMENTS A VALENCES MULTIPLES AU COURS DE LA MATURATION DES VINS

L'importance des catalyseurs métalliques, tels que le fer et le cuivre, au cours des processus oxydatifs, ayant lieu dans les vins en présence d'oxygène, a été mise en évidence en 1933 par RIBÉREAU-GAYON (2). En outre, il a été remarqué que les traces de cuivre paraissent avoir une influence profonde sur le développement du bouquet du vin (3).

En ce qui concerne le rôle du manganèse, RIBÉREAU-GAYON remarque que « des additions de manganèse, élément normal des vins, ne modifient pas sensiblement les vitesses d'oxydation et son rôle paraît beaucoup plus secondaire que ceux du fer et du cuivre » [*op. cit.* (2) p. 52].

Quelques années plus tard, en 1940, et aussi ultérieurement KOTCHERGA (4) a étudié l'influence des métaux lourds sur le potentiel d'oxydo-réduction des vins, c'est-à-dire sur les processus oxydo-réducteurs, mais cette fois-ci en absence d'oxygène de l'air. Ces recherches ont démontré que l'oxygène ne constitue pas un agent indispensable au cours de la maturation des vins.

Les conceptions de KOTCHERGA, basées sur les échanges électroniques entre les métaux et les corps oxydo-réducteurs du vin, ont été vérifiées expérimentalement. Les essais ont portés sur les métaux tels que le fer, cuivre, manganèse, zinc, nickel, cobalt, cadmium, plomb, argent.

Pour effectuer ces expériences KOTCHERGA éliminait d'abord les métaux présents dans les vins, à l'aide de ferrocyanure de potassium ; après l'introduction du métal choisi, la réaction était activée par le chauffage à 75° pendant 3 heures, ensuite, après l'élimination du métal, les déterminations du potentiel d'oxydo-réduction et de l'indice d'oxygène clôturaient cette série d'opérations (5).

En définitive, les métaux expérimentés peuvent être classés en trois groupes. Le groupe des métaux neutres, sans changement de valence — zinc, nickel, cobalt, cadmium, plomb — ne produit aucune influence sur le potentiel d'oxydo-réduction des vins. Le groupe des métaux réducteurs comprend le manganèse qui détermine, étant introduit à l'état manganeux, la baisse sensible du potentiel avec la formation du péroxyde insoluble. Le cuivre, le fer et l'argent constituent le troisième groupe des métaux oxydants. Pour les deux premiers métaux, les oscillations des valences sont reversibles ; ces changements ininterrompus caractérisent le fer ; par contre, le cuivre retient plus solidement l'oxygène, étant sous forme cuivrique ; sa désoxygénation lente à lieu surtout en absence d'oxygène libre dans le vin. L'argent constitue un oxydant rapide ; il s'élimine par précipitation. Au point de vue de l'augmentation du potentiel ce métal occupe la première place, ensuite vient le fer et finalement le cuivre.

En raison de leur influence sur le potentiel d'oxydo-réduction, le manganèse, le fer et le cuivre sont considérés par KOTCHERGA comme des rédoxrégulateurs. Ces métaux, modifiant leur valence dans le vin, agissent sur son potentiel et, par voie de conséquence, sur sa qualité. Les métaux augmentant le potentiel sont susceptibles d'agir sur la maturation des vins dans le sens aboutissant aux caractéristiques propres aux vins de dessert alcoolisés ou doux. Les métaux abaissant le potentiel favorisent les modifications du goût et du bouquet comparables à ceux obtenus au cours de la conservation du vin en bouteille, c'est-à-dire à l'abri de l'air.

D'après KOTCHERGA, l'utilisation pratique du cuivre et du manga-

nèse est prévisible : le premier pour l'accélération des processus oxydatifs (au cours de la madérisation, pour l'obtention des vins du type Porto); le deuxième pour le freinage d'oxydation, pour la conservation d'un niveau suffisamment bas du potentiel et, par conséquent, pour l'accélération des réactions de la maturation dans les bouteilles ou dans les cuves, caractérisées par la diminution du potentiel d'oxydo-réduction.

Nous avons reproduit dans le tableau I les résultats obtenus par KOTCHERGA, au point de vue du potentiel et de l'examen organoleptique, après le traitement d'un vin par le manganèse.

L'auteur a utilisé un vin de quatre mois, ayant subi un soutirage et conservé avant l'expérience dans un fût. Les échantillons de ce vin étaient conservés dans des récipients en verre soudés. Après la démétallisation des vins à l'aide du ferrocyanure de potassium, on effectuait les mesures du potentiel et l'examen organoleptique.

TABLEAU I

Influence du manganèse sur le potentiel d'oxydo-réduction et sur les qualités organoleptiques d'un vin (d'après KOTCHERGA) [*op. cit.* (4-c) *p.* 63]

N°	Mn		Potentiel d'oxydo-réduction E_H en mV			Observations
	Méquiv. par litre	mg/l	dans 1 mois	dans 3 mois	dans 6 mois	
1	Témoin	0	+ 405	+ 398	+ 387	Bouquet et goût d'un vin jeune.
2	0,125	6,9	380	362	340	Bouquet légèrement différent.
3	0,250	13,8	364	336	316	Bouquet prononcé d'un vin vieux.
4	0,375	20,6	355	325	291	Net bouquet d'un vin vieux.
5	0,500	27,5	348	311	279	Vin trop vieilli.

Il ressort de ces résultats que les quantités de métal et la durée du traitement jouent un rôle respectif. Remarquons que l'influence de la température n'a pas été étudiée. *A priori*, l'utilisation des catalyseurs métalliques permettent de diminuer la durée du traitement thermique. Pour FROLOV-BAGREEV et AGABALIANTZ l'emploi pratique de ces catalyseurs (Cuivre, manganèse) suppose la démétallisation ultérieure à l'aide du ferrocyanure [*op. cit.* (5) p. 206-207], d'ailleurs, autorisée en Russie.

Signalons pour mémoire que RODOPOULO (6) a vérifié l'influence des métaux tels que le fer, le cuivre et le manganèse au cours de la champagnisation ; les expériences ont démontré que pendant la fermentation secondaire et après le dégorgeage ces métaux ne jouent aucun rôle en raison de l'absence d'oxygène dans les vins.

L'influence des microéléments sur le potentiel des vins, en présence ou en absence d'air, est extrêmement importante pour l'évolution du vin au cours de sa maturation. Toutefois, leur rôle ne s'arrête pas là, puisque leur présence détermine également les qualités organoleptiques des vins. Nous avons vu précédemment que les traces de cuivre sont favorables à la plénitude du bouquet des vins (*op. cit.* (3)).

Il ressort des constatations faites par les œnologues soviétiques et signalées dans notre note, parue en 1952 (7), qu'il existe un parallélisme entre les teneurs des vins en manganèse et en molybdène et les appréciations organoleptiques.

Les graphiques donnés dans l'ouvrage de FROLOV-BAGREEV et AGABALIANTZ (*op. cit.* (5), p. 192) montrent que les quantités élevées de ces métaux correspondent à une meilleure qualité des vins.

Ces auteurs signalent que les teneurs de manganèse varient entre 0,5 et 5 mg par litre. Pour les vins français de Vitis Vinifrera FLANZY et THÉROND (8) ont trouvé que la teneur de ce métal n'atteint que rarement 2 mg par litre.

MAUMENÉ (9) et PATUREL (10) ont trouvé rarement des doses de 5-7 mg par litre, PEYNAUD (11) a constaté dans divers vins des doses de ce métal variant entre 0,6 et 7, 2 mg par litre. D'après ALMEIDA (12), les vins de Porto en contiennent de 0,5 à 2,5 mg par litre.

DENIGÈS, CHELLE et LABAT (13) signalent les doses exceptionnelles de 9 mg par litre ; au-dessus de 10 mg, il y a certitude d'addition d'un produit manganèsifère, par exemple, de permanganate de potassium pour le désulfitage.

Signalons aussi que les recherches de FLANZY (14) ont démontré que le manganèse, existant naturellement dans le moût, se retrouve presque en totalité dans le vin fait ; d'autre part, l'action de ce métal sur le développement de l'acescence dans les vins apparaît nettement. Le fait que le vin conserve presque intégralement le manganèse du moût, est vraiment important compte tenu du rôle particulier du manganèse au cours du métabolisme de la matière vivante. Toutefois, les quantités de ce métal, trouvées dans les vins, ne sont pas élevées par rapport à celles présentes dans les farines de blé, par exemple.

LEPKOVSKY (15), dont le travail est cité dans le mémoire de DUFRENOY et GENEVOIS (163) indique les quantités suivantes de fer, de manganèse et de cuivre contenues en mg par kilo.

	Farine blanche	Farine entière
Fer	7	44
Manganèse	20	70
Cuivre	1,5	6

On sait, en outre, que ce sont les légumes secs et les céréales qui contiennent les plus grandes quantités de manganèse (17). L'organisme hu-

main absorbe donc avec le pain des quantités de manganèse beaucoup plus grandes que celles que l'on peut trouver dans les vins.

Quant aux teneurs du molybdène dans les vins, elles sont très faibles ; en effet, FROLOV-BAGREEV et AGABALIANTZ [*op. cit.* (5), p. 190-191] signalent qu'elles sont comprises entre 0,1 et 0,001 mg par litre. Comme on le sait, le molybdène joue également un rôle important dans le métabolisme des organismes vivants.

Nous avons insisté tout particulièrement sur le manganèse et le molybdène en raison de notre choix de ces métaux pour les recherches sur la régulation de la maturation des vins doux naturels.

III. — RECHERCHES PERSONNELLES

Les essais ont été effectués sur les mêmes vins expérimentés au cours des recherches sur le traitement thermique [*op. cit.* (1)]. La même remarque se rapporte aux méthodes analytiques utilisées. Le manganèse a été dosé électrophotométriquement à l'état de permanganate après oxydation des ions de manganèse à l'aide de périodate (18).

Les résultats obtenus peuvent être classés en deux catégories ; la première catégorie comprend les résultats des expériences effectuées avec l'addition du manganèse, seul, sans ou avec l'intervention du traitement thermique ; la deuxième englobe les résultats des essais en présence de molybdène et du manganèse avec l'intervention du traitement thermique.

Le traitement thermique à l'abri de l'air, à 40°-45°C, ne différait en rien de celui expérimenté précédemment par nous [*op. cit.* (1)].

Pour plus de clarté ajoutons que les résultats obtenus en présence de catalyseurs métalliques sont toujours comparé dans nos tableaux avec ceux constatés au cours des essais ne comportant aucune addition de métaux. Cela signifie que les données déjà citées dans le premier mémoire seront de nouveau reproduites partiellement ou en entier ; d'ailleurs, cette confrontation et cette comparaison sont nécessaires pour mieux ressortir les modifications constatées.

A. — Étude de l'influence des additions de manganèse en fonction des différents régimes thermiques

Les recherches sur l'influence des additions de manganèse sous forme de sulfate, suivies ou non de traitement thermique prolongé, à l'abri de l'air, ont été effectuées sur les vins rosés, rouges et blancs.

a) Vins doux naturels rosés

Nous avons utilisés pour cette série d'essais d'orientation les vins doux naturels rosés obtenus au laboratoire à partir du mélange, en parties égales, des jus de Grenache et de Macabéo.

Ces vins ont été déjà utilisés lors de nos recherches sur le traitement thermique [*op. cit.* (1)]. L'alcoolisation à 10 p. 100 a été effectuée, à l'aide d'une eau-de-vie de vin, par deux procédés : par l'affusion graduelle d'alcool en trois fois et par la diffusion de vapeurs alcooliques suivant notre procédé (19). En premier lieu nous avons utilisé pour nos expériences le vin obtenu par le premier procédé. Un certain nombre d'échantillons de ce vin ont été enrichis en manganèse sous forme de sulfate (7 mg, 14 mg, 21 mg de métal par litre) ; une moitié de ces échantillons a subi le traitement thermique à l'abri de l'air à 40°-45°C ; l'autre a été laissée à la température du laboratoire. Le volume maximum ne dépassait pas 400 ml ce qui nous a permis d'effectuer d'autres analyses en plus de l'examen organoleptique.

Le tableau II présente les résultats de cet examen, effectué, d'une part, 8 jours après la fin du traitement et, d'autre part, après 12 mois environ.

Il ressort de ces résultats que la dégustation comparative permet de constater la persistance du goût d'alcool même dans l'échantillon tout simplement chauffé ; ce défaut n'existait pas dans les vins chauffés et enrichis en manganèse. La préférence se partageait entre les vins les plus riches en ce métal. Même au bout d'un an leur avance en âge organoleptique était considérable : 2 ans en plus. D'une façon générale, les vins enrichis paraissaient être différents du vin initial. Il se peut que leur bonté était partiellement redevable à l'emploi de l'eau-de-vie de vin. D'ailleurs, elle contenait un peu d'anhydride sulfureux ; ce défaut n'était plus perceptible dans les vins traités.

Les dégustations des vins, additionnés de mêmes quantités de manganèse et laissés à la température du laboratoire, ont donné la préférence au vin enrichi de 14 mg de manganèse par litre. Ce vin a conservé sa place au cours de deux dégustations ayant eu lieu dans 3 semaines et dans 3 mois.

Les résultats des examens organoleptiques sont consignés dans le tableau III.

De tout ce qui précède on peut conclure que l'addition du manganèse, suivie ou non du traitement thermique, modifie profondément la qualité organoleptique des vins doux naturels de cette catégorie.

Les vins traités paraissent beaucoup plus vieux. Toutefois, le traitement thermique provoque des modifications beaucoup plus rapides et plus heureuses au point de vue du changement de couleur et des particularités organoleptiques acquises.

TABLEAU II

V. D. N. récolte 1952 (mélange de Grenache rouge et de Macabéo)
Traitement commencé le 25 novembre 1952 ; durée du chauffage 10 jours
Volume utilisé 350-390 ml

Mn ajouté mg/litre	Dégustation 15-19/XII-1952		Dégustation 19/XII-1952		Dégustation 1/XII-1953		
	Classement	Observations	Classement	Observations	Classement	Age apparent	Observations
a) Témoin non chauffé.....	5	Léger goût de raisin, eau-de-vie non amalgamée.	3	Goût d'alcool, vin jeune.	4	—	Vin jeune, goût d'alcool.
b) 0	4	Supérieur au précédent.	2	Couleur saumon, goût d'alcool, meilleur que le témoin.	3	—	Goût d'alcool, meilleur que le témoin.
c) 7	3	Inférieur au précédent.	2	Moins rosé, goût de pistache.	2	—	Plus fait, plus astringent.
d) 14	1	Bon, pas de goût d'eau-de-vie, meilleur.	2	Moins rosé, goût de pistache.	1	2	Très bon, vin complètement vieilli, goût d'alcool disparu.
e) 21	2	Inférieur au précédent, goût de fruit sec.	1	Jaune foncé, goût de pistache accentué, plus vieux.	1	2	Très bon vin, vieux, sans goût d'alcool.

Tableau III

V.D.N. récolte 1952 (mélange de Grenache rouge et de Macabéo)
Traitement à froid commencé le 25 novembre 1952 ; volume utilisé 350-390 ml.

Mn mg/litre	Dégustation 17/XII 1952		Dégustation 1/XII 1953		
	Classement	Observations	Classement	Age apparent	Observations
0	4	goût d'alcool	3		paraît jeune
7	2	fruité, goût de raisin, goût d'alcool moins fort	2		plus vieux, arôme plus prononcé
14	1	meilleur, plus sec, plus souple	1	2	un peu plus de finesse, odeur agréable
21	3	goût d'alcool			

Nous avons également appliqué les traitements divers au même vin obtenu par l'alcoolisation en phase vapeur.

Les résultats sont consignés dans le tableau IV.

Tableau IV

V.D.N. récolte 1952 (mélange de Grenache rouge et de Macabéo)
alcoolisé par diffusion en vapeur.
Essais commencés le 26 novembre 1952, volume utilisé 250-400 ml.

Vins	Dégustation 19/XII-1952			Dégustation 2/XII-1953	
	Note sur 20	Classement	Observations	Classement	Observations
a) témoin	14	2	plus coloré, saveur de grenache, arôme jeune odeur d'alcool	2	bon vin
b) chauffé 10 jours	16	1	jaune foncé, saveur de grenache accentuée, plus sec, plus viéilli, rancio	1	plus fondu, plus fruité, meilleur
c) addition de 14 mg de Mn par litre chauffé 10 jours	10	3	léger goût amer	3	bon vin
d) vin obtenu par trois affusions (non traité)	9	4	couleur saumon, arôme jeune, goût d'alcool	3	bon vin

La vin additionné de 14 mg de manganèse par litre et chauffé 10 jours ne paraissait pas bien bonifié par rapport à l'échantillon uniquement chauffé pendant le même nombre de jours. La présence du manganèse a provoqué un léger goût amer. On a constaté aussi, que le vin obtenu par le procédé habituel de 3 affusions a été distancé même par le vin à alcoolisation en phase vapeur.

Les analyses effectuées (voir le tableau V) ont montré que le vin additionné de manganèse contenait une petite quantité d'acétals. Appa-

remment l'amélioration ne serait pas liée à la présence d'acétaldéhyde et d'acétals. C'est bien certain que d'autres essais plus rigoureux sont nécessaires pour formuler les conclusions d'un caractère plus général.

TABLEAU V

Vin doux naturel, récolte 1952 (mélange de Grenache rouge et de Macabéo, alcoolisation en phase vapeur)
Données analytiques

Vins	Alcool % vol.	Sucre g/litre	Acidité H_2SO_4 g/litre		Fer mg/litre	Mn mg/litre	Acétal-déhyde mg/litre	Acétals en acétal-déhyde mg/litre
			Volatile	Totale				
a) Témoin.....	16,3	124	0,35	2,8	12,6	1,52	45,7	néant
b) Vin chauffé 10 jours.....	—	—	—	—	—	—	45,7	néant
c) Vin + 14 mg Mn par litre chauffé 10 jours	—	—	—	—	—	—	42,0	6,0

b) **Vins doux naturels rouges**

Le vin de Grenache rouge, récolte 1952, en provenance de Tautavel (P. O.), a été déjà expérimenté au cours des études sur le traitement thermique. L'addition de 5 mg de manganèse par litre et le chauffage pendant 10 jours permet d'obtenir un vin vieux se plaçant entre les échantillons chauffés pendant 10 et 15 jours, ce qui signifie la possibilité d'écourter la durée du traitement thermique.

Les résultats de la dégustation sont consignés dans le tableau VI.

TABLEAU VI

V.D.N. Grenache rouge, récolte 1952 [Tautavel (P. O.)]
Volume du vin traité — 400 ml

Traitement			Dégustation, mars 1953		
Durée jours	Date de début	Mn mg/litre	Classement	Age apparent par rapport au témoin en années	Observations
Témoin.....	—	—	4		Vin jeune
10 jours.....	6/11-1952	—	3	1	Vin vieux
10 jours.....	«	5	2	1 1/2	idem, paraît encore plus vieux
15 jours.....	«	—	1	2	Vin vieux, bien différent du témoin, meilleur vin.

c) Vins doux naturels blancs

Les essais du traitement thermique des vins blancs, du type Grenache blanc, tels quels ou additionnés de 5 mg de manganèse par litre, ont démontré que pour les vins expérimentés la présence de ce métal ne donne pas lieu à une amélioration particulière de leurs qualités organoleptiques. En effet, le chauffage seul pendant 10 jours permettait d'obtenir des résultats aussi appréciables. Il se peut que d'autres doses, moindres ou supérieures à celles utilisées, soient nécessaires.

De toute façon les vins traités ont été supérieurs au témoin qui gardait les caractères d'un vin jeune, même au bout de 12 mois après la première dégustation.

Les conclusions des examens organoleptiques sont consignés dans le tableau VII.

TABLEAU VII

V.D.N. Grenache blanc, récolte 1952 [Tuchan (Aude)]
Volume du vin traité 1000 ml.
Date du début du traitement le 6 février 1953

Traitement		Dégustation 22/6/1953		Dégustation 22/6/1954	
Durée en jours	Mn mg/l	Classement	Observations	Classement	Observations
Témoin . . .	—	4	goût d'alcool, jeune.	4	paraît plus jeune, goût d'alcool.
10	—	1	vin vieux, goût d'alcool moindre, meilleur vin.	1	plus souple, plus vieux, meilleur vin, goût d'alcool bien moindre.
10	5	2	plus vieux que le témoin, très bon vin.	2	id.
15	—	3	vin vieux, bon.	3	vieux, goût de rancio.

Au mois d'avril 1955 nous avons effectué les dosages du manganèse dans les échantillons chauffés pendant 10 jours.

TABLEAU VIII

Vins	Fer total mg/l	Manganèse mg/l
a) Chauffé 10 jours	3,3	0,64
b) même + 5 mg de Mn, par litre, chauffé 10 jours .	—	5,25

Les résultats des dosages démontrent la faiblesse des teneurs initiales en fer et en maganèse ; d'autre part, le manganèse introduit ne s'élimine pas.

Nous verrons plus tard que les vins doux naturels blancs ou rouges expérimentés conservent aussi ce métal introduit même en quantité plus grande.

Les essais effectués avec le même type de vin en provenance d'Estagel (P. O.) nous ont confirmé les conclusions faites lors des expériences comprenant seulement le traitement thermique [*op. cit.* (1)].

La qualité de la récolte, non décelée par les analyses habituelles, joue un rôle considérable.

Si pour les vins de récolte 1951 le chauffage de 10 jours a produit un effet maximum, pour les vins de récolte 1952 le traitement le plus favorable était celui de 15 jours.

Pour les vins de récolte 1951 l'influence améliorante du manganèse, ajouté en raison de 5 mg par litre, était comparable à celle du traitement thermique seul ne comportant aucune addition de ce métal. Quant aux vins de récolte 1952, l'addition du manganèse n'a pas produit son effet ce que démontre les résultats des examens organoleptiques consignés dans le tableau IX.

TABLEAU IX

V.D.N. Grenache blanc [Estagel (P. O.)]

Début de traitement le 4 mars 1953 Volume du vin traité — 1 litre

Traitement		Récolte 1951 Dégustation 17-XI 1954		Récolte 1952 Dégustation 17-XI 1954	
Durée en jours	Mn mg/l	Classement	Observations	Classement	Observations
a) Témoin.....		5	Goût d'alcool, paraît plus trapu.	3	Goût d'alcool, plus fruité.
b) 10 jours.....		1	Plus harmonieux.	2	Peu de différence par rapport au témoin.
c) 10 jours.....	5	2	Bon vin, bon goût.	4	Goût d'alcool, peu de différence avec le témoin.
d) 15 jours.....		4	Bon vin, picotement.	1	Plus fin, légèrement rancio, plus fondu, plus souple.
e) 21 jours.....		3	Bon vin, meilleur que le précédent.	5	Ressemble au (*c*), moins généreux, moins souple par rapport au précédent.

Les dosages du manganèse dans le vin témoin et le vin additionné de manganèse ont confirmé les constatations précédentes en ce qui concerne la non-élimination naturelle de ce métal au cours du traitement thermique.

TABLEAU X

Vins	Fer total mg/litre	Manganèse mg/litre
Estagel, récolte 1952. Témoin ..	18,6	0,8
Vin additionné de 5 mg par litre et chauffé pendant 10 jours ..	—	6,0

B. — Étude de l'influence des additions du manganèse et du molybdène en fonction des différents régimes thermiques

L'étude de l'influence des additions du manganèse et du molybdène, conjointement avec le traitement thermique, a été effectuée sur un vin doux naturel rouge (Grenache rouge), récolte 1952, déjà utilisé lors des recherches concernant le rôle du traitement thermique seul.

Les additions de manganèse et de molybdène ont été faites sous forme de sulfate de manganèse et de molybdate de sodium (Na^2MoO^4 $2H^2O$) ; ensuite les vins enrichis ont été chauffés à l'abri de l'air à 40°-45°C.

Les premières dégustations ont eu lieu tout de suite après la fin du traitement.

Les résultats obtenus sont groupés dans le tableau XI.

Les vins enrichis de manganèse et chauffé pendant 15 et 10 jours ont été reconnus meilleurs, malgré une légère amertume.

La présence de ce métal a modifié sensiblement l'âge organoleptique du vin initial de sorte que le vin traité paraissait être plus âgé de 2 ans par rapport au témoin.

Cette avance variait pour les vins expérimentés suivant la quantité de manganèse et le nombre de jours du chauffage. La dégustation partielle effectuée après 10 mois a fait ressortir la qualité du vin additionné de 1 mg de molybdène et de 5 mg de manganèse.

Après chaque dégustation les vins ont été transvasés, à l'abri de l'air, dans d'autres récipients et laissés ensuite dans la cave cimentée de notre établissement. Les vins n° 1, n° 2, n° 3, n° 4 et n° 12, qui n'ont subi aucun examen organoleptique après le traitement, faisaient partie de ce lot.

Bien entendu, les bouteilles, soigneusement obturées, ont été conservées couchées. Un nouvel examen organoleptique a eu lieu 14 mois après. La dégustation a été effectuée en deux stades. Les résultats obtenus sont groupés, en raison de commodité, dans le tableau XII.

Les vins n° 1, n° 6, et n° 10 occupent les deux premières places dans le classement. Le vin n° 11 (10 mg de manganèse, 15 jours de chauffage), jugé comme le plus vieux de tous les vins, a reculé par rapport aux dégustations précédentes en raison du goût de caramel, de la sensation du picotement constatés.

Tous les vins traités ont été supérieurs au témoin. Toutefois, pour les vins n° 7, n° 8 le goût astringent constaté, sans trop les dégrader, favorisait une certaine hésitation pendant les appréciations organoleptiques. Par contre, le vin n° 9, avec le maximum des deux métaux, accusait nettement l'inconvénient de leur excès. Sans aucun doute, la dose de 1 mg de molybdène est déjà élevée.

En tout cas, ces recherches d'orientation ont démontré l'influence

Tableau XI

V.D.N. Grenache rouge, récolte 1952 [Villeneuve-les-Corbières] (Aude)

Vins n°	Traitements				Dégustation 3/2-1953		Mars 1953			Dégustation 4/12-1953		
	Durée jours	Date début	mg/litre Mn	mg/litre Mo	Classement	Observations	Classement	Age apparent	Observations	Classement	Age apparent	Observations
Témoin	—	—	—	—	7	Vin jeune, goût d'alcool	4	0	—	5	—	Jeune, goût d'alcool prononcé.
N° 4	10	23/1/53	—	—	6	Bon vin	3	+ 1	Vin vieux	4	—	Moins doux, plus âgé, bouquet, goût d'alcool atténué.
N° 10	15	17/1/53	—	—	3	Plus fruité, plus harmonieux	3	+ 1	—	4	—	*Idem*
N° 3	10	»	5	—	—	—	—	—	—	2	+ 1	Fin, très bon bouquet, plus âgé, pas de goût d'alcool.
N° 5	10	»	10	—	2	Bon, légère amertume	2	+ 1 1/2	Vin vieux	—	—	—
N° 11	15	»	10	—	1	Meilleur que le précédent, vin vieux	1	+ 2	Vin vieux	—	—	—
N° 6	10	23/1/53	—	1	5	Moins bon que n° 5 et n° 11	—	—	—	1	+ 1	Plus fin que le n° 3, donne satisfaction à boire.
N° 7	10	»	—	5	5	*Idem*	—	—	—	—	—	—
N° 8	10	»	10	1	4	Meilleur que n° 6 et n° 7	—	—	—	3	—	Plus âgé, plus astringent que les précédents.
N° 9	10	»	10	5	4	*Idem*	—	—	—	—	—	—

Tableau XII

Vin doux naturel, Grenache rouge, récolte 1952
[Villeneuve-les-Corbières (Aude)]

Vins n°	Traitement			Dégustation 6/IV-1954	
	Durée jours	mg/litre		Classement	Observations
		Mn	Mo		
Témoin..	—	—	—	8	Couleur affaiblie, plus madérisé, plus astringent, goût d'alcool.
N° 1 ...	3	10	—	1	Couleur plus vive, meilleur goût, plus âgé, très différent par rapport au témoin.
N° 2 ...	5	—	—	4	Bon vin.
N° 3 ...	5	10	—	6	Bon vin, rape la langue.
N° 4 ...	10	—	—	7	Bon vin.
N° 5 ...	10	10	—	5	Bon vin.
N° 6 ...	10	—	1	2	Très bon vin.
N° 7 ...	10	—	5	3	Très bon vin, astringence.
N° 8 ...	10	10	1	4	*Idem*.
N° 9 ...	10	10	5	7	Moins bon que le n° 7 et n° 8.
N° 10 ...	15	—	—	1	Très bon vin, vieilli.
N° 11 ...	15	10	—	3	Plus vieux vin de tous les vins essayés ; goût de caramel, picotement.
N° 12 ...	non chauffé	10	—	6	Couleur plus jaune, moins fruité, plus souple que le témoin, pas de goût d'alcool.

favorable du manganèse et du molybdène conjointement avec le traitement thermique. Il existe donc une possibilité d'effectuer la régulation de la maturation des vins doux naturels en fonction de la présence de ces deux métaux et des régimes thermiques :

Nous avons fait pour les vins, additionnés du manganèse, une observation, déjà mentionnée précédemment, concernant la non-élimination de ce métal au cours du traitement thermique.

Le tableau XIII résume les résultats obtenus.

Tableau XIII

Vin doux naturel rouge [Villeneuve-les-Corbières (Aude)]

Vins n°	Traitement		Résultat des dosages	
	Durée en jours	Mn ajouté mg/litre	Mn mg/litre	Fer total mg/litre
Témoin	—	—	1,08	6,3
N° 1.....	3	10	11,0	—
N° 3.....	5	10	11,8	—
N° 11.....	15	10	12,8	—

Il ressort des résultats des dosages que le manganèse reste en entier dans les vins ; l'erreur au cours de l'addition du manganèse est seule responsable de la teneur un peu élevée du métal pour le vin n° 11 par rapport à la somme des quantités naturelle et additionnelle.

L'addition du manganèse provoque l'abaissement considérable du potentiel d'oxydo-réduction.

Nous avons effectué les mesures potentiométriques dans quelques vins conservés dans les bouteilles intactes pendant 15 mois après leur traitement thermique. Le vin nº 12 non traité par la chaleur a également une valeur suffisamment basse du potentiel. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau XIV.

TABLEAU XIV

Influence de la présence du manganèse et du traitement thermique sur le potentiel des vins doux naturels rouges, conservés à l'abri de l'air pendant 15 mois. (Date des mesures pontentiométriques. Avril 1954).

Vins	Traitement thermique début 17/1-1953		Mesures potentiométriques		
	Durée jours	Mn mg/litre	Température	pH	E_H moyen mV
Témoin	—	—	19	3,12	+ 340
Nº 1.....	3	10	16	3,18	+ 90
Nº 2.....	5	—	21	3,15	+ 218
Nº 3.....	5	10	21	3,15	+ 202
Nº 4.....	10	—	20	3,15	+ 255
Nº 12.....	—	10	21	3,12	+ 153

D'autre part, nous avons également déterminé le potentiel d'oxydo-réduction dans les vins déjà dégustés (voir le tableau XI) et, par conséquent, plus ou moins aérés, au cours de l'examen organoleptique. Transvasés à l'abri de l'air dans d'autres récipients, ces vins ont été conservés, comme nous l'avons déjà dit, dans la cave cimentée de notre station. De sorte que les uns sont resté dans les bouteilles couchées pendant 15 mois, les autres pendant 5 mois.

Principalement le manque de matière première, ensuite l'insuffisance de l'appareillage du chauffage sont responsables de cette manière d'opérer.

Néanmoins, comparativement les mesures du potentiel pouvaient nous donner une idée approximative sur les variations du potentiel dans ces vins.

Le tableau XV contient les résultats obtenus.

Le chauffage seul produit une influence sensible sur le potentiel ce qui constitue un fait bien connu.

Dans nos essais le potentiel était élevé en présence de molybdène ce qui démontrerait, peut-être, l'inactivité de ce métal dans le domaine des changements du potentiel, surtout si l'on tient compte de sa forme chimique employée, molybdate de sodium. Comme nous l'avons déjà vu, de tels vins ont été reconnus bons ou très bons, malgré la légère astringence constatée.

En présence du manganèse, l'action du molybdène sur le potentiel

Tableau XV

Potentiels d'oxydo-réduction de quelques vins doux naturels rouges.

Vins	Traitement thermique			Mesures potentiométriques		
	Durée jours	mg/litre		Température	pH	E_H moyen mV
		Mn	Mo			
Témoin	—	—	—	19	3,12	+ 340
N° 4	10	—	—	20	3,15	+ 203
N° 10	15	—	—	19	3,12	+ 235
N° 6	10	—	1	20	3,13	+ 338
N° 7	10	—	5	20	3,10	+ 367
N° 8	10	10	1	21	3,13	+ 312
N° 9	10	10	5	21	3,10	+ 207

paraît s'atténuer. Toutefois, le nombre d'essais n'est pas suffisant pour faire une conclusion définitive. En outre, les essais ont porté seulement sur un vin rouge ce qui interdit toute généralisation prématurée concernant les vins doux naturels rouges et blancs.

C. — **Discussion des résultats obtenus**

L'ensemble des résultats obtenus au cours de recherches relatées précédemment donne lieu à des constatations intéressantes.

D'une façon générale, l'enrichissement des vins en manganèse, suivi du traitement thermique, permet d'obtenir rapidement l'amélioration de leurs qualités organoleptiques, variables avec les conditions des essais.

Les vins doux naturels rouges ou rosés ont montré une aptitude réactionnelle supérieure à celle des vins doux naturels blancs, tout au moins au cours de nos expériences.

Les modifications survenues, à chaud ou même à froid, dans tels vins les rapprochent nettement de la catégorie des vins du type Porto vieux. La présence du manganèse permet d'écourter la durée du traitement thermique ; déjà la teneur additionnelle de 5mg de ce métal par litre est souvent suffisante. Au goût les vins traités possèdent une variété de nuances souvent recherchées dans la pratique ; le goût d'alcool disparaît et l'âge organoleptique des vins est souvent en avance de 2 ans par rapport au témoin ce qui constitue une bonification appréciable.

Les essais avec les vins doux naturels rosés ont montré que de tels mélanges sont souhaitables. En effet, les vins doux naturels blancs, utilisés au cours de nos expériences, n'ont pas été aussi aptes à l'amélioration nette comparativement aux vins rouges ; cela dépendrait de la composition chimique, bien différents, des vins blancs. En outre, l'ap-

titude aux modifications heureuses de leurs qualités organoleptiques semble dépendre des facteurs non décelables par l'analyse chimique habituelle.

Il se peut que dans ces vins le manganèse ajouté intervient sous une forme moins active au point de vue catalytique. En effet, cette supposition est fort plausible, puisque ce métal ne s'élimine pas au cours du traitement thermique. Si la présence du manganèse détermine la baisse du potentiel d'oxydo-réduction, le molybdène ne paraît pas la favoriser, peut-être, en raison du type du sel employé. Le peu d'expériences effectuées laisse supposer que l'activité améliorante de ce métal n'est pas nécessairement liée aux teneurs élevées dépassant 1 mg par litre. D'ailleurs, les recherches ont portés seulement sur un vin rouge.

La présence simultanée du manganèse et du molybdène, à doses modérées, serait favorable à l'amélioration des qualités des vins.

Malgré l'insuffisance de nos essais d'orientation, nous avons pu montrer l'utilité de l'enrichissement des vins doux naturels en manganèse et en molybdène.

Si les œnologues russes ont constaté l'interdépendance entre les teneurs naturelles de ces microéléments et la qualité des vins, nous avons cherché à établir les limites approximatives de cet enrichissement par une expérimentation préalable sur les vins avant de le proposer pour l'alimentation de la vigne, comme suite aux soins culturaux spéciaux.

D'ailleurs, un certain nombre de recherches les plus récentes ont démontré tout l'intérêt de l'alimentation radiculaire (20) et extra-radiculaire de la vigne par les composés du manganèse surtout en présence du bore (21). L'utilisation de ces microéléments accélère la maturation du raisin, augmente la quantité de la récolte et sa teneur en sucre. Toutefois, nous n'avons pas trouvé les données analytiques concernant l'enrichissement du raisin en manganèse.

Il serait très utile de suivre les modifications apportées par ces traitements à l'ensemble des microéléments dans le raisin et dans le vin.

Les éléments nous manquent pour voir l'importance de l'équipement des vins doux naturels en microéléments tels que le fer, le cuivre et, en particulier, le manganèse et le molybdène, ainsi que la liaison entre leurs teneurs et les propriétés organoleptiques de ces vins.

Il semblerait que cet enrichissement naturel, en commençant par le raisin, et, à la rigueur, celui artificiel des vins soit souhaitable pour les vins doux naturels, destinés ou non a être améliorés par le traitement thermique.

Au fait, nous ne savons rien au sujet de l'éventualité des troubles métalliques correspondants, d'ailleurs, peu probable à notre avis. Nous n'avons pu suivre le sort du molybdène dans les vins traités. En effet,

malgré tout l'intérêt de son dosage, nous ne sommes pas encore arrivés aux conclusions définitives soit dans le choix, soit dans la mise au point d'une méthode analytique compatible avec les quantités, très faibles, de ce métal, existantes naturellement dans les vins.

Le traitement thermique, seul ou effectué en présence du manganèse et du molybdène, détermine, comme on le sait, l'amélioration des qualités organoleptiques des vins.

En nous basant sur les résultats de nos analyses et sur les constatations analytiques de nos prédécesseurs, nous pensons que les modifications des substances polyphénoliques, de sucres, les réactions entre les sucres et les substances protéiniques, en général, seraient responsables, en grande partie, des changements positifs décelés par l'examen organoleptique.

Toutefois, les températures, caractérisant le procédé du traitement thermique employé, n'excluent pas l'éventualité d'un regain d'activité des enzymes se trouvant dans les vins.

Il ressort de tous ce qui précède que les recherches sur la maturation des vins doux naturels, sur sa régulation sont encore insuffisament développées pour donner des réponses plus ou moins définitives à toutes les questions posées par l'élaboration de ces produits de haute qualité.

IV. — CONCLUSION

Les recherches effectuées sur la régulation de la maturation des vins doux naturels à l'aide des catalyseurs métalliques particuliers, tels que le manganèse et le molybdène, en fonction de différents régimes thermiques, ont démontré non seulement l'importance des améliorations, d'ailleurs, rapidement obtenues, des qualités organoleptiques des vins ainsi traités, mais également la diversité des changements constatés.

Le manganèse et le molybdène, composants naturels du jus de raisin et des vins, pourraient être considérés comme répères de la qualité des vins doux naturels, fait établi pour d'autres vins par les œnologues soviétiques. Dans ces conditions l'enrichissement du raisin et du vin en ces microéléments pose des problèmes importants en ce qui concerne le choix rationnel du terrain, des soins culturaux modernes, l'emploi de procédés œnotechniques, permettant l'extraction la plus complète à partir de la grappe et la conservation dans le vin de ces agents catalytiques ; ces problèmes sont d'autant plus importants que les métaux mentionnés existeraient, sans doute, dans les vins, à côté du fer et du cuivre, à l'état de combinaisons organiques, douées d'une activité catalytique plus grande que celle de leurs sels minéraux.

L'ensemble de recherches effectuées à pour but d'attirer l'attention des œnologues sur le rôle des microéléments à valences multiples.

Il peut être lié à celui du traitement thermique dans l'amélioration de la qualité des vins de dessert et, en particulier, des vins doux naturels.

Reçu par publication le 13 juillet 1955.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) DEIBNER (L.), BÉNARD (P.). — Recherches sur la maturation des Vins Doux Naturels. I. Influence du traitement thermique prolongé à l'abri de l'air. *Ann. Tech. Agr. I. N. R. A.*

(2) RIBÉREAU-GAYON (J.). — Contribution à l'étude des oxydations et réductions dans les vins. 1933, Bordeaux, Delmas éd.

(3) RIBÉREAU-GAYON (J.). — *a*) Interprétation scient. de la pratique œnologique du vieillissement. *Bull. Office Int. Vin.*, juillet, 24, 1949. — *b*) *Traité d'œnologie*, 220, 1947, Paris-Liège, Béranger éd.

(4) KOTCHERGA (P.). — *a*) Influence des métaux lourds sur le potentiel d'oxydo-réduction des vins. Thèse, *Institut Vit. Enol. Krasnodar*, S. S. S. R. 1940. — *b*) Sur la théorie du vieillissement des vins. *Vinodélié i Vinogradarstvo S. S. S. R.*, nº 1-2, 18, 1943. *c*) Sur la theorie du vieillissement du vin. — *Trav. Inst. Industrie Alim. Krasnodar*, nº 6, 27, 1949.

(5) FROLOV-BAGREEV (A.), AGABALIANTZ (G.). — *Chimie du vin*, 205, 1950 ; Moscou, Pischepromizdat éd.

(6) RODOPOULO (A.). — Modification du potentiel d'oxydo-réduction et de la quantité de l'oxygène dissous dans les vins au cours de la champagnisation. *Vinodélié i Vinogradarstvo*, nº 9, 3, 1944.

(7) DEIBNER (L.). — Aperçu des recherches effectuées en URSS sur le rôle des microéléments pour la biochimie du raisin et du vin. *Ann. Tech. Agr.*, I. N. R. A. **1,** nº 1, 177, 1952.

(8) FLANZY (M.), THÉROND (L.). — Le manganèse dans les vins de Vitis Viniféra et les vins d'hybrides. *Ann. Tech. Agr.*, **1,** 67, 1938. *Revue Vit.*, **90,** 345, 454, 1939.

(9) MAUMENÉ (E.). — Sur l'existence du manganèse dans les vins. *C. R. Ac. Sci.*, **98,** 1416, 1884.

(10) PATUREL (G.). — Le manganèse et les vins. *Progrès agr.*, **48,** 504, 1907.

(11) RIBÉREAU-GAYON (J.), PEYNAUD (E.). — *Analyse et contrôle des vins*, 729, 1947, Paris-Liège, Béranger éd.

(12) DE ALMEIDA (H.). — O Manganés nos Vinhos do Porto. *Anaïs Inst. Vonho Porto*, 233, 1941.

13) DENIGÈS (G.), CHELLE (L.), LABAT (A.). — *Précis de chimie analytique*, **2,** 261, 1930, Paris, Maloine, éd.

(14) FLANZY (M.). Observations sur le manganèse en œnologie. *C. R. Ac. Agr.*, Fr. **24,** 319, 1938. — *Bull. Office Int.* Vin, nº 119, 23, 1938. — Manganèse et vin. *Revue Vit.*, **48,** nº 2285, 277, 1938.

(15) LEPKOVSKY. — *Phys. Rev.*, **23,** 329, 1944.

(16) DUFRENOY (J.), GENEVOIS (L.). — L'addition de vitamines et de sels minéraux aux aliments aux États-Unis. Une politique d'amélioration de l'alimentation nationale. *Ann. Nat. Alim.*, **1,** nº 4, 389, 1947.

(17) DOMANGE (L.). — Les éléments minéraux dans les matières alimentaires. Mise au point de chimie anal. pure et appliquée et d'analyse bromatologique. Série I, 4, 1953, Paris, Masson éd.

(18) Mme Bouzigues (L.), Bouzigues (H.). — Dosage électrophotomètrique des traces de manganèse dans les moûts et les vins. *Ann. Tech. Agr.*, I. N. R. A. *5*, nº 3, 425, 1956.

(19) Deibner (L.), Bénard (P.). — Nouveau procédé d'alcoolisation des vins spéciaux par diffusion graduelle des vapeurs alcooliques. *Ind. Agr. Alim.*, **69,** nº 12, 881, 1952.

(20) Menagarischvili (A.), Lejava (V.). — *Vinodélié i Vinogradarstvo*, nº 6, 1950.

(21) *a*) Bouchine (P.). — Microengrais dans les vignobles d'Ouzbékistan. *Vinodélié i Vinogradarstvo*, nº 12, 19, 1951. — *b*) Filipenko (J.). — Alimentation extra-radiculaire du raisin. *Vinodélié i Vinogradarstvo*, nº 2, 34, 1952. — *c*) Vnoukova (A.), Rija (V.). — Rôle des composés du manganèse et du bore. *Vinodélié i Vinogrdarstvo*, nº 3, 33, 1955.

POTENTIEL D'OXYDO-RÉDUCTION ET SES RELATIONS AVEC LES PROPRIÉTÉS ORGANOLEPTIQUES DES VINS DOUX NATURELS.

PAR

Léonce DEIBNER

Station centrale de Recherches sur l'Œnologie,
la Cidrerie et les Jus de Fruits, à Narbonne.

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Introduction.

II. — Travaux antérieurs.

III. — Recherches personnelles.

A. — Principe et techniques des essais.
B. — Résultats obtenus.
a) Vins doux naturels rouges.
b) Vins doux naturels blancs.
C. — Discussion des résultats.

IV. — Conclusion.

Bibliographie.

I. — INTRODUCTION

Concurremment à trois sens, la vue, l'odorat et le goût, d'autres facteurs physiques, mécaniques, psychiques, participent, d'ailleurs, à différents degrés d'importance, à l'appréciation des qualités organoleptiques des vins. Si leur rôle respectif se trouve suffisamment défini dans les ouvrages et les publications œnologiques, celui du potentiel d'oxydo-réduction apparaît de beaucoup moins évident, surtout au point de vue de sa propre influence exercée sous forme d'impulsions électriques perçues par l'appareil gustatif de l'homme.

Notre mémoire traitera uniquement de la relation entre le potentiel et les propriétés organoleptiques des Vins Doux Naturels. Comme on le sait, il est important, au point de vue technologique, d'établir pour ces vins la valeur optimum du potentiel correspondant à l'épanouissement intense de leurs qualités. Notre étude, entreprise à titre d'essai d'orien-

tation, a pour but de dégager, dans la mesure du possible, quelques conclusions sur la signification pratique de la relation présumée entre le potentiel et les appréciations organoleptiques de ces vins de dessert.

II. — TRAVAUX ANTÉRIEURS

Les relations entre le potentiel d'oxydo-réduction et les substances responsables des qualités organoleptiques des vins ont été mises en évidence pour la première fois par GELOSO (1).

Les expériences de BAYLET et de CANALS (2) ont conclu dans le même sens, malgré la différence des méthodes employées.

Pour RIBÉREAU-GAYON (3) le bouquet du vin est dû à la présence de substances qui n'ont une odeur agréable que sous leur forme réduite ; son intensité serait en relation avec le potentiel d'oxydo-réduction limite atteint. En outre, le développement du moelleux, du coulant est lié, au moins en partie, à l'apparition des mêmes substances qui déterminent le bouquet. Les recherches effectuées par KOTCHERGA (4) l'ont amené à conclure que les substances responsables du bouquet du vin se forment et se maintiennent aux valeurs suffisamment basses du potentiel et que leur nature chimique varie en fonction de ces valeurs.

Pour KOTCHERGA les processus, déterminant la maturation et le vieillissement du vin, sont basés sur l'échange électronique entre les composants et les vecteurs d'électrons ; cet échange peut se faire aux dépens soit des ressources propres au vin, soit des agents extérieurs.

La délimitation des valeurs du potentiel d'oxydo-réduction pour chaque type de vins, en fonction des stades de leur évolution et des sortes de raisin, constitue un problème technologique important. La maturation des vins de table, des vins de dessert, des vins alcoolisés est liée avec les processus différents s'effectuant aux niveaux différents du potentiel ; c'est ainsi que la maturation des vins de table exige une valeur basse du potentiel correspondant aux réactions de réduction. Dans cet ordre d'idées le point de vue de KRASSINSKY et PRIACHINA est original et mérite d'être retenu (5). Pour ces chercheurs la maturation des vins en bouteille est liée avec le déplacement des systèmes oxydo-réducteurs organiques, probablement en présence de déhydrases, dans le sens de réduction. Les essais avec l'emploi d'hydrogène gazeux montrent que le vin, conservé plusieurs semaines après le passage de ce gaz dans une bouteille obturée, possédait un bouquet amélioré ; en même temps on observait la baisse du potentiel de 400 mV à 250 mV. Des résultats intéressants ont été obtenus avec l'introduction des différents systèmes oxydo-réducteurs organiques tels que l'acide pyruvique-acide lactique, acide ascorbique-acide déhydroascorbique ; les autolysats des levures ont été efficaces en raison de la présence des déhydrases et probablement des systèmes

oxydo-réducteurs. On trouvera d'autres considérations à ce sujet dans l'ouvrage de FROLOV-BAGREEV et AGABALIANTZ (6).

Ces savants soulignent que l'établissement des optima du potentiel pour les différents types des vins doit être effectué à la suite de recherches rationnelles. Les valeurs basses du potentiel sont nécessaires au cours de la champagnisation, pendant l'élaboration des vins du type Muscat. Par contre, les vins du type Tokay, Porto, Madère, Jerez, nécessitent un niveau plus élevé du potentiel (*op. cit.* (6) p. 204).

Également, pour SCHANDERL (7) un potentiel optimum correspond à chaque type de vin. En ce qui concerne les vins blancs et les vins mousseux, RODOPOULO (8) attribue la baisse du potentiel de 350 mV à 209 mV à la formation de l'acide dioxymaléique, ce qui est lié en même temps à l'amélioration du goût de ces vins.

Comme on le sait, les acides dicétosuccinique et dihydroxymaléique se forment à partir de l'acide tartrique suivant le mécanisme dont l'état actuel a été exposé par nous dans un mémoire spécial (9).

Précisons tout de suite que c'est une réaction irréversible. Suivant la valeur du potentiel, nous sommes en présence de corps différents. Dans ces conditions, il est incorrect, au point de vue chimique, de dire, par exemple, que le bouquet des vins vieux est dû à des substances très oxydables qui ne possèdent leur odeur agréable que sous leur forme réduite (*op. cit.* (3*a*) p. 953 ; (3*d*) p. 79). Une telle expression sous-entend qu'il existerait des substances, bien définies, susceptibles d'être présentes soit sous la forme réduite, soit à l'état oxydé. Tout simplement, il s'agit toujours de substances différentes ; dans le cas mentionné trois acides, tartrique, dihydromaléique et dicétosuccinique interviennent.

Il est facile de constater que les recherches systématiques concernant les relations entre le potentiel d'oxydo-réduction et les propriétés organoleptiques d'un même vin, en fonction des modifications provoquées par un traitement défini, ne sont pas nombreuses. Tout récemment KOCH et BRETTHAUER (10) ont fait appel aux ultrasons pour étudier corrélativement les modifications du bouquet des vins de raisin et de fruits et celles de leur potentiel. Les résultats obtenus montrent que les changements de ce dernier influent non seulement sur la stabilité des boissons alcooliques, mais également sur leur saveur, leur bouquet.

D'intéressantes constatations ont été faites par KOCH (11) en ce qui concerne les modifications du potentiel et du goût des jus de pomme en fonction des additions d'acide ascorbique.

En effet, l'addition de cet acide au jus mentionné modifie très peu le pH, légèrement l'acidité totale, sensiblement le potentiel d'oxydo-réduction, de sorte que la langue perçoit la sensation acide pour un niveau déterminé du potentiel, sans que les valeurs de l'acidité totale et du pH soient accrues. En se basant sur les constatations de REICHARD (12)

concernant le rôle des impulsions électriques au cours des perceptions olfactives, KOCH admet que les perceptions gustatives sont également conditionnées par ces impulsions ; dans ces conditions notre langue est susceptible de « mesurer le potentiel ». D'après KOCH, il est indispensable de tenir compte, pendant l'examen organoleptique des aliments, tels que les vins et les jus de fruits, du potentiel d'oxydo-réduction. Ce dernier occupera sa place à côté d'autres facteurs comme température, état psychique, sensation tactile, etc., influençant les sens, olfactif et gustatif.

III. — RECHERCHES PERSONNELLES

A. — Principe et technique des essais

Nous avons cherché, en premier lieu, à établir la relation entre les propriétés organoleptiques et le potentiel d'oxydo-réduction des vins doux naturels. De tels essais supposent la comparaison d'une série de vins, issus d'un même vin à l'aide d'un procédé approprié, modifiant les caractéristiques du vin initial en fonction des particularités du mode opératoire.

Nos recherches sur la maturation des vins doux naturels (13) nous ont permis de satisfaire aux conditions énoncées. Intentionnellement nous avons évité de compliquer notre tâche par des essais comprenant l'addition des différents systèmes oxydo-réducteurs, et, en particulier, de l'acide ascorbique. Les mesures du potentiel d'oxydo-réduction ont été effectuées en présence du gaz carbonique suivant la technique établie par nous (14). Toutes les valeurs du potentiel figurant dans les tableaux de ce mémoire sont rapportées au potentiel normal d'hydrogène. Les dégustations des vins ont été faites par plusieurs personnes, toujours les mêmes ; les résultats cités dans différents tableaux correspondent à des moyennes, sauf dans les cas où la divergence des avis nous obligeait de la signaler.

Les résultats des mesures potentiométriques ne sont pas accompagnés de ceux concernant les indices d'oxygène et des peroxydes ; d'ailleurs, nos recherches sur les méthodes de leur évaluation ne sont pas encore terminées. Les essais effectués ont porté sur les vins doux naturels rouges et blancs. Avant de commencer l'exposé des résultats obtenus, il nous semble utile de rappeler que les valeurs basses du potentiel ne correspondent pas toujours à la meilleure qualité des vins, même s'ils ont été conservés à l'abri de l'air. Le tableau I relate les résultats des mesures potentiométriques concernant deux vins rouges, conservés en bouteilles au laboratoire : le premier pendant deux ans et le deuxième pendant quatre ans. Le vin n° 1 avait l'aspect tuilé, mais son goût, son acidité le rendaient impropre à la consommation.

Bien entendu, le vin de presse n'avait pas qualité d'un bon vin.

TABLEAU I

Potentiels d'oxydo-réduction de quelques vins rouges conservés à l'abri de l'air dans les bouteilles couchées

Vin (provenance, récolte, type)	Mesures potentiométriques				
	Date de la mesure	Température	pH	E_H moyen en mV en présence de	
				gaz carbonique	azote
1) Coursan (Aude), 1952, ordinaire, sulfité, bouteille à limonade.....	3/12/54	20°5	3,5	+ 183	+ 198
2) Tuchan (Aude), 1949, vin de presse, bouteille cachetée	29/6/54	29°5	3,65	+ 186	—

Quant aux vins rouges à l'état de vidange, citons le cas d'un vin de Corbières de récolte 1952, recouvert de fleur de vin. Au début ce vin a été conservé dans une bouteille d'un litre pleine et couchée. Ensuite on l'a vidée à moitié et on l'a laissée debout, en la bouchant bien, pendant plusieurs jours.

Voici les résultats des analyses :

Degré alcoolique	11°6
Acidité volatile	1,2 en grammes de H_2SO_4 par litre
Acidité totale	4,5 en grammes de H_2SO_4 par litre
pH	3,4
Potentiel d'oxydo-réduction à 20°C	+ 203 (en présence d'azote).

Ces quelques exemples montrent que les valeurs suffisamment basses du potentiel ne correspondent pas toujours aux réactions de bonification ayant lieu dans les vins. L'influence des conditions de conservation, de la composition du vin, de son type joue un rôle important.

B. — Résultats obtenus

a) Vins doux naturels rouges

Plusieurs échantillons d'un vin doux naturel rouge, Grenache, récolte 1952, en provenance de Villeneuve-les-Corbières (Aude), ont subi les différents traitements consignés dans le tableau II.

TABLEAU II

Vin doux naturel, Grenache rouge, récolte 1952, *Villeneuve-les-Corbières* (*Aude*)

Vins	Traitement			
	Date de début	Durée jours	mg par litre ajoutés	
			Mn	Mo
Témoin				
N° 1	17/1/53	3	10	—
N° 2	»	5	—	—
N° 3	»	5	10	—
N° 4	»	10	—	—
N° 6	23/1/53	10	—	1
N° 7	»	10	—	5
N° 8	»	10	10	1
N° 9	»	10	10	5
N° 10	17/1/53	15	—	—
N° 11	»	15	10	—
N° 12	»	à température ambiante	10	—

Le chauffage à l'abri de l'air, à 40°-45°C a été effectué suivant le mode opératoire exposé ailleurs (*op. cit.* (13)).

En premier lieu nos essais ont porté sur les vins restés pendant 15 mois après la fin des traitements dans les bouteilles couchées et bien obturées.

Le tableau III résume les résultats des mesures potentiométriques et de l'examen organoleptique.

TABLEAU III

Vin doux naturel, Grenache rouge, récolte 1952 (*Villeneuve-les-Corbières Aude*). — *Date des mesures et de l'examen organoleptique : avril* 1954.

Vins	Mesures potentiométriques			Dégustation	
	Température	pH	E_H moyen mV	Classement	Observations
Témoin ...	19	3,12	+ 340	5	Couleur affaiblie ; odeur, goût d'alcool ; plus madérisé, plus astringent.
N° 1	16	3,18	+ 90	1	Couleur plus vive ; très différent du témoin ; meilleur goût ; plus âgé, avance d'un an au moins.
N° 2	21	3,15	+ 218	2	Vin très bon, mais inférieur au précédent.
N° 3	21	3,15	+ 202	4	Inférieur au n° 2 et au n° 3, rape la langue.
N° 12	21	3,12	+ 153	3	Couleur plus jeune ; moins fruité, plus simple que le témoin ; pas de goût d'alcool ; moins bon que le n° 2.

On constate que dans le cas du vin n° 1 la valeur basse du potentiel et l'appréciation organoleptique vont de pair par rapport au témoin et à d'autres échantillons.

Le vin n° 12, conservé en présence de manganèse à la température ambiante, n'a pas paru supérieur au vin n° 2, malgré sa valeur du potentiel suffisamment basse. En considérant le vin témoin et trois vins, n° 1, n° 2, n° 3, ayant subi le traitement thermique, il est facile de constater la correspondance entre leurs potentiels et leur classement au point de vue de propriétés organoleptiques.

Une deuxième série d'essais concernant les vins dégustés peu après leur traitement et ensuite conservés, après leur transvasement, dans les bouteilles couchées. Par conséquent, ces vins ont subi une légère aération au cours des dégustations.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau IV.

TABLEAU IV

Vin doux naturel, Grenache rouge, récolte 1952, (*Villeneuve-les-Corbières. Aude*). — *Date des déterminations : avril* 1954

Vins	Mesures potentiométriques			Dégustation	
	Température	pH	E_H moyen mV	Classement	Observations
Témoin . . .	19	3,12	+ 340	4	Goût d'alcool, astringent ; bon vin.
N° 4	20	3,15	+ 255	3	Légèrement supérieur au témoin.
N° 10-*a* . .	19,0	3,12	+ 235	1	Très bon vin, pas de goût d'alcool.
N° 10-*b* . .	19,0	3,12	+ 312	1	Très bon vin, pas de goût d'alcool.
N° 11	19,0	3,12	+ 312	2	Paraît plus vieux, par rapport aux vins précédents ; goût de caramel, picotement.

Si l'échantillon n° 10-*a* se classe premier en correspondance avec la valeur basse du potentiel, le même vin, aéré plus fortement, avec le potentiel supérieur, est à l'égalité de classement. Dans cet ordre de constatations, le vin n° 11 est mieux apprécié que le n° 4. Ici apparaît, pour la première fois dans nos expériences, la constatation que la meilleure appréciation organoleptique peut correspondre à deux niveaux différents du potentiel.

En continuant nos essais avec une autre série de vins, chauffés en présence de manganèse et de molybdène, séparément ou en mélange, nous avons constaté que l'appréciation organoleptique des échantillons, contenant du molybdène, a été supérieure malgré les valeurs bien élevées de leur potentiel.

Ces constatations sont consignées dans le tableau V.

Toutefois, malgré leur potentiel élevé, les échantillons n° 6 et n° 7

TABLEAU V

Vin doux naturel, Grenache rouge ; récolte 1952 (*Villeneuve-les-Corbières. Aude*). — *Date de détermination : avril* 1954

Vins	Mesures potentiométriques			Classement	Dégustation
	Température	pH	E_H moyen mV		Observations
Témoin ...	19	3,12	+ 340	6	Goût d'alcool, astringent.
N° 4.....	20	3,15	+ 255	5	Bon vin, pas de goût d'alcool, légèrement supérieur au témoin.
N° 6.....	20	3,13	+ 338	1	Très bon vin, astringent.
N° 7.....	20	3,10	+ 367	2	Idem ; moins bon que le précédent.
N° 8.....	21	3,13	+ 312	3	Idem ; moins bon que le précédent.
N° 9.....	21	3,10	+ 207	4	Moin bon que le n° 7 et le n° 8.

ont subi des modifications favorables à la bonification de leurs qualités par rapport au témoin caractérisé également par la valeur élevée du potentiel. Cela laisse supposer que les substances agréables au goût et à l'odeur peuvent se former à différents niveaux du potentiel. Nous savons aussi que les rapports entre les substances présentes ou formées au cours des traitements jouent un rôle considérable. Par exemple, le goût spécifique des vins du type Jerez est lié au rapport : $\frac{\text{acétaldéhyde}}{\text{acétals}}$, comme l'ont montré SISSAKIAN et ses collaborateurs (15). En général, ce rapport ne dépasse par 4-4,5. Or, SAENKO (16) a constaté que le chauffage de ces vins à 42°C pendant 50 jours diminue ce rapport à 2,08-2,35 en produisant en même temps des vins bien caractéristiques, harmonieux, supérieurs au témoin, caractérisé par le rapport 4,5-5,8 et paraissant par comparaison jeune, peu équilibré. Les traitements convenablement appliqués sont susceptibles de produire des vins également appréciés malgré la différence des potentiels. Le type du vin, sa composition jouent aussi leur rôle important. De sorte qu'on peut obtenir les vins meilleurs au point de vue de leurs propriétés organoleptiques et possédant des valeurs élevées du potentiel d'oxydo-réduction, malgré que la valeur optimum préconisée de ce dernier est comparativement plus basse. Par exemple, d'après AGABALIANTZ (17), les vins destinés à la champagnisation doivent avoir vers la fin de leur maturation le potentiel d'oxydo-réduction de + 250 mV. En se basant sur la constatation que les qualités naturelles de ces vins se perdent au cours de leur maturation prolongée (3-5 ans), MATCHAVARIANI (18) a étudié la maturation accélérée de tels vins. A cet effet, le même vin a subi l'influence des techniques différentes ; finalement une série de vins obtenus a été soumise à l'analyse et à la dégustation. La meilleure appréciation a été donnée aux vins caracté-

risés par les valeurs élevées du potentiel (335 mV) par rapport au témoin (265 mV). D'autre part, un vin traité a été reconnu supérieur à ce dernier, malgré l'identité des valeurs du potentiel.

Remarquons en passant que habituellement dans les vins conservés dans les fûts, le potentiel, vers la fin de cette conservation, est de 280-300 mV (*op. cit.* (6), p. 203) ; pour les vins blancs destinés à la champagnisation les limites seraient de 250 mV à 300 mV (19). Ces quelques exemples montrent que les relations entre le potentiel d'oxydo-réduction et les qualités des vins décelées par la dégustation ne sont pas simples.

Dans le cas des vins doux naturels rouges expérimentés, nous avons constaté que la meilleure appréciation organoleptique ne correspond pas toujours à la valeur basse du potentiel par rapport à celui du témoin. Par conséquent, la relation entre les qualités organoleptiques et le potentiel n'a pas un caractère absolu.

Dans ces conditions, il serait utile d'établir pour les vins doux naturels les limites du potentiel compatibles avec le maximum de leurs qualités organoleptiques. Sans doute, à chaque type de ces vins devrait correspondre les potentiels optima. Encore faut-il comparer les avantages respectifs des différents niveaux du potentiel au point de vue de la valeur organoleptique des substances, pour le moment inconnues, qui se forment dans des conditions bien déterminées.

b) Vins doux naturels blancs

Les expériences ont porté sur les vins blancs, Grenache blanc, de deux provenances différentes.

La première série comprenait les vins d'Estagel (P. O.) de deux récoltes consécutives.

Les résultats des essais sont consignés dans les tableaux VI et VII.

Étant donné la divergence entre les conclusions d'une majorité et d'une minorité des dégustateurs, nous étions amenés à les préciser à part, en désignant par la lettre B l'opinion minoritaire.

Pour le vin de récolte 1951 il n'y avait aucun désaccord au sujet de l'attribution de la première place dans le classement ; toutefois, le vin (*d*) avec le potentiel le plus bas occupe la dernière place, sans tenir compte du témoin. Dans l'ensemble les vins étaient bons ; leurs potentiels ne s'écartaient pas trop des vins par rapport aux autres ; toutefois, le témoin paraissait être à part.

Pour le vin de récolte 1952, le vin (*d*) avec la valeur plus basse du potentiel occupe la première place ; dans l'ensemble, les vins étaient bons. Quoique les éléments plus nombreux nous manquent pour faire un jugement plus général, il est possible d'admettre que l'assimilation d'alcool se ferait mieux à potentiel plus bas.

Tableau VI

Vin doux naturel, Grenache blanc (Estagel-P. O.), Récolte 1951. *Dégustation : novembre* 1954

Vins	Mesures potentiométriques			Classement		Observations
	Température	pH	E_H moyen mV	A	B	
a) Témoin	19	3,42	+ 213	5	2	A. goût d'alcool, goût de miel, plus piquant B. plus trapu, plus corsé
b) Chauffé 10 jours	19	3,42	+ 190	1	1	harmonieux, plus fondu, très fruité, arome meilleur
c) + 5 mg Mn/litre, chauffé 10 jours	19	3,42	+ 195	2	3	A. bon goût, très fruité B. un petit goût de cuit
d) chauffé 15 jours.....	19	3,42	+ 179	4	4	A. moins bon que (e) B. sensation de picotement
e) chauffé 21 jours	19	3,42	+ 198	3	4	B. sensation de picotement A. bon, plus harmonieux que (d)

Tableau VII

Vin doux naturel, Grenache blanc, (Estagel-P. O.), Récolte 1952, *Dégustation : novembre* 1954

Vins	Mesures potentiométriques			Classement		Observations
	Température	pH	E_H moyen mV	A	B	
a) Témoin	20	3,5	+ 234	3	3	A. bon vin, goût d'alcool fruité B. odeur très légère du caramel
b) Chauffé 10 iours	19	3,5	+ 270	2	3	A. harmonieux, fruité ; odeur, goût meilleur que le témoin B. bon vin, comme témoin
c) + 5 mg Mn/litre, chauffé 10 jours	19	3,5	+ 219	4	2	A. goût d'alcool, fruité comparable au témoin B. comparable à (e)
d) chauffé 15 jours.....	20	3,5	+ 187	1	1	A. bon vin, plus harmonieux, plaisant B. goût plus agréable ; plus fin
e) chauffé 21 jours .....p.	20	3,5	+ 215	5	2	A. goût d'alcool, une pointe d'amertume B. légèrement supérieur au témoin au point de vue goût, odeur

Nous avons eu l'occasion de faire quelques essais sur les vins, venus de l'extérieur et conservés, après transvasement à l'abri de l'air, au laboratoire pendant 15 mois au moins, dans des bouteilles couchées. Ces vins,

issus d'une même récolte, ont été conservés à la cave dans différents récipients : foudre en vois, bonbonne en verre sur la terrasse, cuve en ciment. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau VIII.

TABLEAU VIII

Vin doux naturel blanc, récolte 1950 (*Estagel* (*P. O.*)).
Dégustation : octobre 1954

Mode de conservation	Mesures potentiométriques			Classement	Observations
	Température	pH	E_H moyen en mV		
1) Foudre bois	17	3,4	+ 278	3	Goût d'alcool, amertume.
2) Bonbonne en verre, terrasse.	18	3,38	+ 216	2	Fruité, harmonieux.
3) Cuve en ciment	15	3,48	+ 220	1	Très bon vin, moins souple que le suivant.
4) Mélange commercial, type vieux.....	16	3,43	+ 255	1	Meilleur vin.

La préférence des dégustateurs, allant vers le vin conservé dans une cuve en ciment, était en concordance avec la valeur la plus basse du potentiel ; toutefois, le vin ayant subi l'exposition du soleil dans une bonbonne en verre paraissait plus souple ; d'ailleurs, son potentiel ne différait pas de celui du vin précédent. Remarquons que le mélange commercial avec le potentiel plus élevé a été reconnu comme le meilleur.

D'autres essais, effectués avec un vin blanc, Grenache blanc de Tuchan (Aude), récolte 1952, nous ont montré que les modifications favorables au goût et à l'odeur peuvent se produire au même niveau du potentiel par rapport à celui du témoin. Ces constatations sont présentées dans le tableau IX.

TABLEAU IX

Vin doux naturel, Grenache blanc, récolte 1952,
(*Tuchan. Aude*). *Date de détermination : 22 juin* 1954

Vins	Mesures potentiométriques			Examen organoleptique	
	Température	pH	E_H moyen en mV	Classement	Observations
Témoin	26,5	3,62	+ 226	4	Goût d'alcool, paraît jeune.
N° 1. Chauffé 10 jours	24	3,62	+ 206	1	Plus vieux, goût d'alcool moindre, plus souple.
N° 2. Additionné de 5 mg de Mn par litre chauffé 10 jours.	27,5	3,62	+ 223	2	Souple, vieux, moins bon que le précédent.
N° 3. Chauffé 15 jours	28	3,62	+ 213	3	Rancio, vieux, souple.

Il ressort de ces résultats que dans certains cas le potentiel ne suit pas les changements notés soit en raison de la polarisation des électrodes de platine qui réagit sur certains constituants électroactifs, soit en raison de la présence des substances différentes, mais correspondant presque au même potentiel dans le vin témoin et les vins traités.

C. — Discussion des résultats

Les techniques de l'élaboration des vins doux naturels mériteraient une étude approfondie et une mise au point rationnelle. Parmi les facteurs à considérer l'action de l'oxygène occupe une place de choix. Faut-il élaborer ces vins à l'abri de l'air, en présence d'une petite quantité d'oxygène ou, au contraire, effectuer leur maturation en faisant un large appel aux processus oxydatifs ?

A ce grand problème se rattache l'étude de la relation entre le potentiel d'oxydo-réduction et l'optimum des propriétés organoleptiques pour chaque type de vin qui nous occupe.

Si l'on se permet, faute d'autres éléments, un certain rapprochement entre les vins doux naturels et les vins de Porto, on serait tenté d'admettre avec Frolov-Bagreev et Agabaliantz (*op. cit.* (6), p. 204) la nécessité de rechercher pour ces vins le niveau élevé du potentiel. Or, d'après les résultats d'un récent travail d'Almeida (20), les potentiels moyens des vins de Porto, conservés plusieurs années en bouteille, varient entre 200 mV et 350 mV ; l'oxydation énergique par l'air remonte ces valeurs à 440-460 mV. Bien entendu, le potentiel dépend de la composition de ces vins.

Joslyn (21) a mesuré dans les vins de Californie du même type les potentiels de l'ordre de 200 mV-250 mV ; les quelques vins, conservés en bouteille, possédaient le potentiel plus élevé, de 390 mV à 420. Malheureusement ces deux publications ne contiennent aucune indication sur la valeur organoleptique de ces vins.

En ce qui concerne l'optimum du potentiel d'oxydo-réduction des vins doux naturels, nous ne sommes pas encore en mesure d'établir une conclusion définitive en raison de la faiblesse relative du nombre des essais.

Quant au décalage entre les limites extrêmes du potentiel optimum, il ne constitue pas une exception. Pour les vins de table, type Riesling, Politova-Sovzenko (22) a montré que ce décalage est 85 mV environ, sans que l'appréciation organoleptique sorte du domaine des annotations de 8 à 10. Pour cet auteur, la qualité des vins est déterminée par une heureuse combinaison de leurs composants chimiques, se trouvant à l'état d'équilibre chimique reversible.

Cet équilibre, se répercutant sur les propriétés organoleptiques des vins, peut être obtenu, comme nous l'avons constaté, pour un niveau

plus élevé du potentiel, ce qui démontre que dans les vins doux naturels les substances responsables du bouquet et du goût agréables ne se forment pas uniquement en correspondance avec les valeurs basses du potentiel.

Cette constatation, à laquelle nous accordons, pour le moment, seulement une signification théorique, ne nous permet nullement d'affirmer que l'élaboration des vins doux naturels de haute qualité doit se faire au potentiel le plus élevé.

Prenons pour principe que les schémas technologiques existants sont souvent fortuits et parfois sans fondement. La technologie rationnelle ne peut ignorer le rôle du potentiel d'oxydo-réduction et surtout l'utilité de connaître sa valeur optimum pour chaque type de vins doux naturels ; par exemple, il serait difficile de nier la nécessité d'assurer la valeur la plus basse possible au cours de l'élaboration des vins à base de Muscat, afin de conserver au maximum leur arôme caractéristique. Remarquons que déjà en 1939 au VIe Congrès International de la Vigne et du Vin à Bad-Kreuznach, M. FLANZY a attiré l'attention sur les caractères distinctifs de la maturation des vins de dessert à la base de Grenache ou de Muscat.

L'établissement de cet optimum ne peut être obtenu qu'à condition d'effectuer une étude détaillée des vins, les meilleurs au point de vue de leurs qualités organoleptiques, et aussi de leurs prototypes.

Les recherches du laboratoire sont susceptibles d'apporter leur contribution importante puisqu'à présent nous savons exactement, grâce aux travaux de GAÏVORONSKAYA (23) que les essais sur la maturation des vins dans les récipients en verre (micro-œnotechnologie) sont susceptibles de donner des résultats fort comparables à ceux obtenus par la technologie habituelle faisant appel aux fûts en bois. En outre, cet œnologue a constaté l'efficacité de l'emploi des ballons en verre de 8 litres par rapport aux bouteilles. Les essais effectués dans ces conditions sur les vins de dessert du type Porto rouge et blanc, du type Muscat, pendant deux ans, ont démontré non seulement la concordance des conclusions concernant les vins conservés en fûts et en ballons de verre, mais même la supériorité de vins séjournés dans les récipients de la dernière espèce.

Les investigations sur la relation entre les propriétés organoleptiques et le potentiel des vins doux naturels doivent faire partie d'un ensemble de recherches, destinées à parfaire nos connaissances de ces vins et, en particulier, à préciser les conditions de la régulation de leur maturation. Entre autres moyens, l'emploi d'un « indice de maturité » basé sur le potentiel d'oxydo-réduction et propre à chaque type de vins, pourrait rendre éventuellement quelques services utiles. Cet indice de maturité oxydo-réductrice est déduit de la connaissance du potentiel optimum moyen et du nombre de jours nécessaires pour l'atteindre à partir d'un potentiel initial déterminé.

Au cours de la maturation la valeur de cet indice se calculerait, après avoir mesuré le potentiel actuel Pa et noté le nombre de jours écoulés J, à l'aide d'une relation qui, dans le cas d'un vin conservé à l'abri de l'air, aurait la forme suivante :

$$\frac{(Pa - Po) \times J}{Po \times C}$$

où C correspond à un coefficient numérique, permettant de diminuer les chiffres obtenus pour plus de commodité.

Disons que KOROTKEVITCH, VROUZNETZOVA (24) ont cherché à évaluer l'effet de l'oxydation d'un vin en fonction du temps à l'aide d'une formule faisant appel à la notion du rH_2. En utilisant les méthodes purement chimiques, ces auteurs indiquent les modes opératoires pour déterminer l'oxydabilité du vin, ainsi que son pouvoir oxydant. GHIMESCU (25) a proposé également la technique du dosage chimique du pouvoir réducteur des vins. MARECA CORTÈS (26) cherche à déterminer l'état « rédox » des vins par des courbes potentiométriques de l'oxydation en fonction du temps à l'aide d'une solution diluée d'iode ; les potentiels de départ et de la fin étant toujours les mêmes. L'étude des courbes, accompagnées du nombre de ml d'oxydant employé, conjointement avec l'examen organoleptique, permet de mieux situer les différences entre les échantillons d'un même type de vin.

Les recherches de cette espèce sont difficiles en raison du peu de connaissances actuelles sur la nature chimique des substances existantes dans les vins et responsables de leurs modifications en relation avec le potentiel d'oxydo-réduction et les propriétés organoleptiques.

Le plan de telles études, donné il y a 25 ans par GELOSO (*op. cit.* (1) p. 277), garde toujours toute sa valeur ; resté à peine réalisé, il peut se résumer ainsi :

1° déterminer la nature des substances en équilibre d'oxydo-réduction ;

2° connaître les conditions de formation de ces substances ;

3° déterminer les phases de l'élaboration et de la conservation auxquelles ces substances apparaissent ou sont transformées ;

4° faire varier une à une la quantité ou le degré d'oxydation de chacune des substances ainsi définies et examiner les variations correspondantes des propriétés organoleptiques.

Bien entendu, GELOSO ne va pas jusqu'à dire que tout, dans le vin, s'explique par des phénomènes d'oxydo-réduction et il s'exprime ainsi : « si quelque chose s'explique par eux, nous pouvons à coup cûr affirmer que nous aurons une action sur de telles propriétés ».

Quant à l'étude des propriétés organoleptiques des vins doux naturels, elle devrait en premier lieu s'effectuer suivant les modalités habituelles exposées dans les différents ouvrages en publications œnolo-

giques (27) (*op. cit.* (3-*b*) p. 1) (28). Ensuite il serait utile de faire appel au contrôle des résultats de l'examen organoleptique par les méthodes de statistique mathématique, introduites en œnologie par l'équipe de chercheurs de la Station Agricole Expérimentale de l'Université de Californie, comme AMERINE, ROESSLER, BAKER, GUYMON, WARREN, HEITZ (29). Les techniques et les problèmes de l'examen organoleptique des vins ont fait l'objet d'un mémoire spécial paru sous les signatures d'AMERINE et de ROESSLER (30). Un article d'AMERINE (31) en langue espagnole est consacré à l'exposé général de ces questions. Tout récemment, AMERINE et FEDUCHY (32) ont appliqué les méthodes statistiques à l'étude des vins espagnols typiques.

En raison de difficultés de toutes sortes, les recherches sur les vins doux naturels demanderont, à côté des moyens matériels importants nécessaires pour leur exécution, aussi un apport non négligeable de la persévérance. L'expérience seule est en mesure de nous montrer, si la voie indiquée est susceptible d'apporter quelques enseignements utiles à l'industrie de ces vins.

IV. — CONCLUSION

La relation entre les propriétés organoleptiques des vins et leur potentiel d'oxydo-réduction constitue, d'une façon générale, un sujet œnochimique peu étudié, malgré tout son intérêt. Cette constatation garde sa valeur en ce qui concerne les vins doux naturels. Notre courte étude a été entreprise pour suppléer, au moins partiellement, au manque de connaissances dans ce domaine particulier. Les résultats obtenus montrent que le bouquet et le goût agréables ne correspondent pas toujours aux valeurs basses du potentiel oxydo-réducteur. En effet, les substances responsables de la bonification des qualités organoleptiques de ces vins sont susceptibles de se former aux différents niveaux du potentiel. Ces enseignements se rapportent aux vins de types déterminés, ayant subi des modifications sous l'influence du traitement thermique, en absence ou en présence d'adjuvants sous forme de micro-éléments métalliques.

D'autres études, plus systématiques et plus développées, seront nécessaires pour établir les conclusions plus générales.

En même temps ces recherches contribueront à la meilleure connaissance des vins doux naturels, indispensable pour la rationalisation de leur élaboration ; d'ailleurs, sans cette connaissance, il ne sera pas possible de répondre efficacement aux soucis constants des producteurs d'obtenir une qualité parfaite et toujours égale de ces vins de choix.

Reçu pour publication le 13 juillet 1955.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) GELOSO (J.). — Relation entre le vieillissement des vins et leur potentiel d'oxydo-réduction. *Ann. Brass. Dist.*, **29,** 197, 258, 276, 277, 1930-1931.

(2) *a*) BAYLET (H.). — Contribution à l'étude des essais physiques des vins. *Thèse Pharm.* Montpellier, 105, 1938.

b) CANALS (E.), BAYLET (H.). — Le potentiel oxydo-réducteur de quelques vins. *Jour. Pharm. Chimie,* **29,** 503, 1939.

(3) RIBÉREAU-GAYON (J.). — *a*) Sur les phénomènes de réduction dans les vins. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **5,** 953, 1938. — *b*) *Traité d'œnologie,* 47, 218, 1950, Paris-Liège, Béranger éd. — *c*) Le potentiel d'oxydo-réduction en œnologie. *Chim. et Ind.*, **68,** nº 1 *bis,* 1952.

d) GENEVOIS (L.), RIBÉREAU-GAYON (J.). — *Le Vin,* 79, 1947, Paris, Hermann éd.

(4) KOTCHERGA (P.). — *a*) Influence des métaux lourds sur le potentiel d'oxydo-réduction des vins, Thése 1949, *Inst. Œnol. Vit. de Krasnodor,* S. S. S. R. — *b*) Sur la théorie du vieillissement des vins. *Vinodélié i Vinogradarstvo,* S. S. S. R. nº 1-2, 18, 1943.

(5) KRASSINSKY (N.), PRIACHINA (E.). — Sur la théorie du vieillissement du vin. *Vinodélié i Vinogradarstvo,* 7, nº 2, 1946.

(6) FROLOV-BAGREEV (A.), AGABALIANTZ (G.). — *Chimie du vin,* 217, 1951, Moscou, Pischepromizdat éd.

(7) SCHANDERL (H.). — *a*) Die Reduktions. Oxydations potentiale während der Entwicklungsphasen des Weines. *Der Weinbau, Wiss. Beihefte,* **2,** 191,209,1948. — *b*) Élaboration et traitement en cave des vins allemands du point de vue de leur potentiel d'oxydo-réduction. *Der Weinbau,* nº 5, 1951 (d'après *Bull. Office Int. Vin,* janvier, 133, 1951). — *c*) *Die Mikrobiologie des Weines,* 69, 1953, Stuttgart, Ulmer Verlag.

(8) RODOPOULO (A.). — *a*) Améliorer la technologie du champagne en vase clos. *Vinodélié i Vinogradarstvo,* nº 11, 33, 1950. — *b*) Rôle des sels du fer des acides org. au cours de la maturation et du vieillissement du vin. *Vinodélié i Vinogradarstvo,* nº 1, 9, 1953. — *c*) Sur les systèmes oxydatifs fermentatifs ou non fermentatifs du moût et du vin. *Biochimiya vinodéliya,* nº 4, 211, 1953, Moscou, Ac. Sci. S. S. S. R. éd.

(9) DEIBNER (L.). — Données actuelles sur les processus de l'oxydation de l'acide tartrique et sur la séparation chromatographique des acides organiques du vin. *Annales de Tech. Agr.* I. N. R. A. *5,* nº 1, 141, 1956.

(10) KOCH (J.), BRETTHAUER (G.). — Der Einfluss von Ultraschallwellen auf der Aroma verschiedener Weine. *Wein und Rebe, Jahrbuch der Weinbauwissenschaft und Önologie.* **26,** 85, 1950-1951.

(11) KOCH (J.). — Ueber die Bedeutung des Redoxpotentials bei der Beurteilung des Geschmacks. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* ; **47,** nº 9, 195, 1951.

(12) REICHARD (B.). — Ueber die Sinnenprüfung von Wein. *Dtsch. Lebensmittel-Rundschau,* **47,** 103, 1951 (d'après le renvoi (11)).

(13) DEIBNER (L.), BENARD (P.). — Recherches sur la maturation des Vins doux naturels. — *a*) I. Influence du traitement thermique prolongé, à l'abri de l'air. *Annales de Tech. Agr.*, I. N. R. A. *5,* nº 3, 357, 1956. — *b*) II. Essai de catalyseurs métalliques. *Annales de Tech. Agr.* I. N. R. A. *5,* nº 3, 357, 1956.

(14) DEIBNER (L.). — Recherches sur les techniques de mesure du potentiel d'oxydo-réduction dans les jus de raisin et les vins. Détermination de ce potentiel dans quelques jus de raisin et quelques vins. *Annales de Tech. Agr.*, I. N. R. A. *5,* nº 1, 31, 1956.

(15) SISSAKIAN (N.), POPOVA (E.), EGOROV (Y.), POUTCHKOVA (U.). — Sur la nature biochimique des vins de Jerèz. *Biochimiya vinodéliya,* nº 2, 69 ; 1948, Ac. Sc. S. S. S. R. éd.

(16) Saenko (N.). — Maturation accélérée du Jérèz. *Vinodélié i Vinogradarstvo*, nº 7, 9, 1953.
(17) Agaballiantz (G.). — Contrôle chimico-technologique de l'élaboration des champagnes soviétiques. 118, 1954, Moscou, Pischepromizdat édit.
(18) Matchavariani (N.). — Accélération de la maturation des vins destinés à la champagnisation. *Vinodélié i Vinogradarstvo* S. S. S. R. nº 10, 21, 1953.
(19) Frolov-Bagreev (A.). — Champagne soviétique. 62, 1948, Moscou, Pischepromizdat éd.
(20) de Almeida (H.). — Contribuiçao para o estudo dos fenômenos de oxidaçao-reduçoa no vinho do Porto. *Anais Inst. Vinho do Porto*, 1952 (tiré-à-part).
(21) Joslyn (M.). — California Wines, *Ind. and Eng. Chem.*, **41**, 587, 1949.
(22) Politova-Sovzenko (T.). — Composition chimique des vins et leur qualité. *Vinodélié i Vinogradarstvo*, nº 2, 10, 1954.
(23) Gaivoronskaya (Z.). — Méthode de maturation du vin dans la microœnologie. *Vinodélié i Vinogradarstvo*, nº 2, 16, 1954.
(24) Korotkevitch (A.). Kouznetzova (K.). — Sur l'étude des réactions d'oxydation dans les vins. *Vinodélié i Vinogradarstvo*, nº 2, 10, 1951.
(25) Ghimescu (G.). — Microdosage du pouvoir réd. tot. du vin et établissement de l'indice calorimétr. ou de la valeur alim. du vin. *Mikrochemie*, **22**, nº 3, 315, 1937.
(26) Mareca Cortès (I.). — Aportacion al estudio de los vinos por sus sistemas « redox ». Potentiometria ; applicaciones tecnicas. *Rev. Ciencia App.*, nº 37, 97, 1954.
(27) Got (N.). — La dégustation des vins, 1953, Perpignan.
(28) Chauvet (J.). — La dégustation des vins, son mécanisme et ses lois. Journée vinicole, Montpellier, nºs , 30 mai, 2 juin, 7 juin, 1951 ; (d'après *Bull. Office Int. Vin*, juin, 172, 1951).
(29) *a*) Amerine (M.). — An application of « triangular » taste testing to wines. *The Wine Review*, **16,** nº 5, 10, 1948.
b) Roessler (E.), Warren (J.), Guymon (J.). — Significance in triangular taste tests. *Food Res.*, **13,** 503, 1948.
c) Heintz (J.), Roessler (E.), Amerine (M.), Baker (G.). — A study of certains factors influencing the composition of California type Sherry during baking. *Food. Res.*, **16,** nº 3, 192, 1951.
d) Baker (G.), Amerine (M.). — Organoleptic ratings of wines estimate from analytical date. *Food. Res.*, **18,** nº 4, 381, 1953.
e) Roessler (E.), Baker (G.), Amerine (M.). — Corrected normal and Chi-Square approximations to the binomial distribution in organoleptic tests. *Food. Res.*, **18,** nº 6, 625, 1953.
f) Baker (G.), Amerine (M.), Roessler (E.). — Errors of the second kind in organoleptic difference testing. *Food. Res.*, **19,** nº 2, 206, 1954.
(30) Amerine (M.), Roessler (E.). — Techniques and problems in the organoleptic examination of wines. *Proc. Amer. Soc. Enol.*, 97, 1952.
(31) Amerine (M.). — Problèmes et techniques de l'examen organoleptique des vins. *Agricultura*, Esp. nº décembre, 1954 (d'après *Bull. Office Intern. Vins*, mars, 96, 1955).
(32) Amerine (M.), Feduchy (E.). — Los résultados de la cata del vino y del análisis químico. *Bol. Inst. Mac. Invest. Agron. Esp.*, **14,** nº 31, 353, 1954.

ÉTUDE DU DOSAGE COLORIMÉTRIQUE DES ALCOOLS SUPÉRIEURS DANS LES EAUX-DE-VIE

PAR

J. LAFON et **P. COUILLAUD**
Station Viticole de Cognac

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Introduction.
II. — Étude de la méthode Rocques.
III. — Méthode Komarowsky.
IV. — Conclusion.

INTRODUCTION

Les eaux-de-vie contiennent de 0 à 600 g d'alcools supérieurs par hl d'alcool pur. Ces alcools supérieurs sont constitués par des produits variés, dont on peut trouver la nature dans divers travaux et en particulier dans ceux d'ORDONNEAU (1) et de HENNING (2).

On peut considérer qu'ils sont représentés en grande partie par des alcools, soit du type amylique, soit du type butylique ou leurs isomères (3).

Deux groupes de méthodes ont été proposés pour doser ces produits en bloc :

— Les méthodes volumétriques, qui, en principe, devraient être les meilleures, car elles n'ont pas de caractère arbitraire.

— Les méthodes colorimétriques, essentiellement arbitraires, car elles ramènent la teneur de l'eau-de-vie en alcools supérieurs à celle d'un témoin de comparaison, composé d'un seul des alcools supérieurs dont est composé le spiritueux.

Les méthodes volumétriques procèdent, soit par extraction directe des alcools supérieurs dans un solvant (méthode ROSE), soit par une extraction suivie de l'oxydation des alcools à l'état d'acide et dosage titrimétrique (méthode ALLEN MAQUART, méthode de l'A. O. A. C.) :

— De la mauvaise extraction des alcools supérieurs par le solvant.

— De l'extraction variable suivant la nature des alcools supérieurs et les conditions opératoires.

Jusqu'à ce jour, aucune modification n'a permis de les rendre exactes ou simplement fidèles.

On peut à ce sujet renvoyer aux travaux de PENNIMAN, de Mme MARIA RITA de LEMOS de ANDRADE PERES (4), ainsi qu'à ceux de GUYMON et NAKAGIRI (5), publiés en 1952.

Les méthodes colorimétriques sont basées sur la coloration produite lorsqu'on met en présence alcools supérieurs et acide sulfurique concentré (méthode MOHLER ROCQUES) (6).

Divers auteurs ont proposé de sensibiliser cette technique, par addition d'aldéhydes aromatiques (UDRANSKY, KOMAROWSKY, BLEYER, DIEMAR, FRANK, PENNIMAN, etc.).

L'intensité de la coloration développée dépend de nombreux facteurs :

— Concentration du spiritueux en alcool éthylique ;
— Quantité d'aldéhyde utilisée ;
— Concentration de l'acide sulfurique employé ;
— Température et durée de la réaction ;
— Nature des alcools supérieurs.

De plus, pour un alcool supérieur donné, l'intensité de la coloration n'est proportionnelle à la teneur en ce produit qu'entre certaines limites.

Dans tous les cas, il est nécessaire d'éliminer au préalable : aldéhydes, cétones et terpènes.

Bien qu'arbitraires, puisqu'elles ne donnent pas la teneur réelle des spiritueux en alcools supérieurs, les méthodes colorimétriques ne sont pas dénuées d'intérêt, et employées toujours dans les mêmes conditions, elles donnent des indices qu'on pourrait appeler par exemple : indice isobutylique, dans le cas où la solution type de comparaison serait constituée par de l'alcool isobutylique, indice isoamylique s'il s'agit d'alcool isoamylique, etc. Ce qu'il faut rechercher, c'est la fidélité.

Les deux méthodes les plus intéressantes sont les méthodes ROCQUES et KOMAROWSKY.

La méthode KOMAROWSKY (7), plus sensible, est bien adaptée au cas des alcools rectifiés. A ce sujet, on peut renvoyer au travail de TOURLIÈRE et ANDRES, paru en 1951, dans *Industries Agricoles* et *Alimentaires* (8).

La méthode ROCQUES convient bien comme sensibilité aux eaux-de-vie de vin et à divers spiritueux. Les normes légales ayant été établies avec celle-ci, nous l'avons étudiée en vue de rechercher les conditions optimum de fidélité et de rendre son emploi commode.

ÉTUDE DE LA MÉTHODE ROCQUES

Après fixation des aldhéhydes, 10 cc de spiritueux distillé à 66°7 sont additionnés de 10 cc d'acide sulfurique concentré et placés pendant 1 h à 120°. La coloration jaune brun obtenue est alors comparée à celle donnée par une solution alcoolique contenant 100 g d'alcool isobutylique par hl alcool pur traité dans les mêmes conditions.

Nous avons étudié successivement les différents facteurs susceptibles d'affecter la coloration obtenue. Les densités optiques ont été évaluées dans les conditions précisées dans une étude sur le dosage colorimétrique des aldéhydes (9).

1° Développement de la coloration en fonction du temps :

Nous avons utilisé des solutions d'alcool isobutylique à 100 g et 200 g par hl d'alcool pur ramenée à 66°7.

Après avoir ajouté 10 cc d'acide sulfurique à 97 p. 100, nous avons suivi l'évolution de la coloration en fonction du temps, en notant les densités optiques toutes les 15 minutes.

On constate que la coloration croît sans cesse.

ROCQUES avait fixé le temps de réaction à une heure. Peut-être aurait-il été préférable de le fixer à 2 heures.

En effet, dans le cas d'une réaction de 1 heure, il convient de respecter ce temps à quelques minutes près et de refroidir les matras aussitôt.

Le graphique ci-après illustre les résultats trouvés :

2° Développement de la coloration en fonction de la quantité d'alcool isobutylique :

Dans les conditions indiquées précédemment : réaction de 1 h à 120°, la densité optique varie proportionnellement à la teneur en alcool isobutylique, jusqu'à une teneur de 250 g par hl d'alcool pur. Au-dessus de cette teneur, l'intensité colorante croît très rapidement pour tendre vers l'opacité complète.

La courbe suivante représente les résultats trouvés :

Il est donc nécessaire de faire des dilutions de manière à avoir, dans la prise d'essai, une teneur en alcools supérieurs inférieure à 250 g par hl d'alcool pur. La méthode officielle recommande avec justesse de se rapprocher le plus possible du témoin de comparaison (soit 100 g).

3° Développement de la coloration en fonction de la température :

La température de réaction pouvant varier accidentellement nous avons cherché à savoir quelle serait l'incidence de ces variations sur les densités optiques.

La réaction d'une heure avec des solutions étalons a été effectuée à différentes températures :

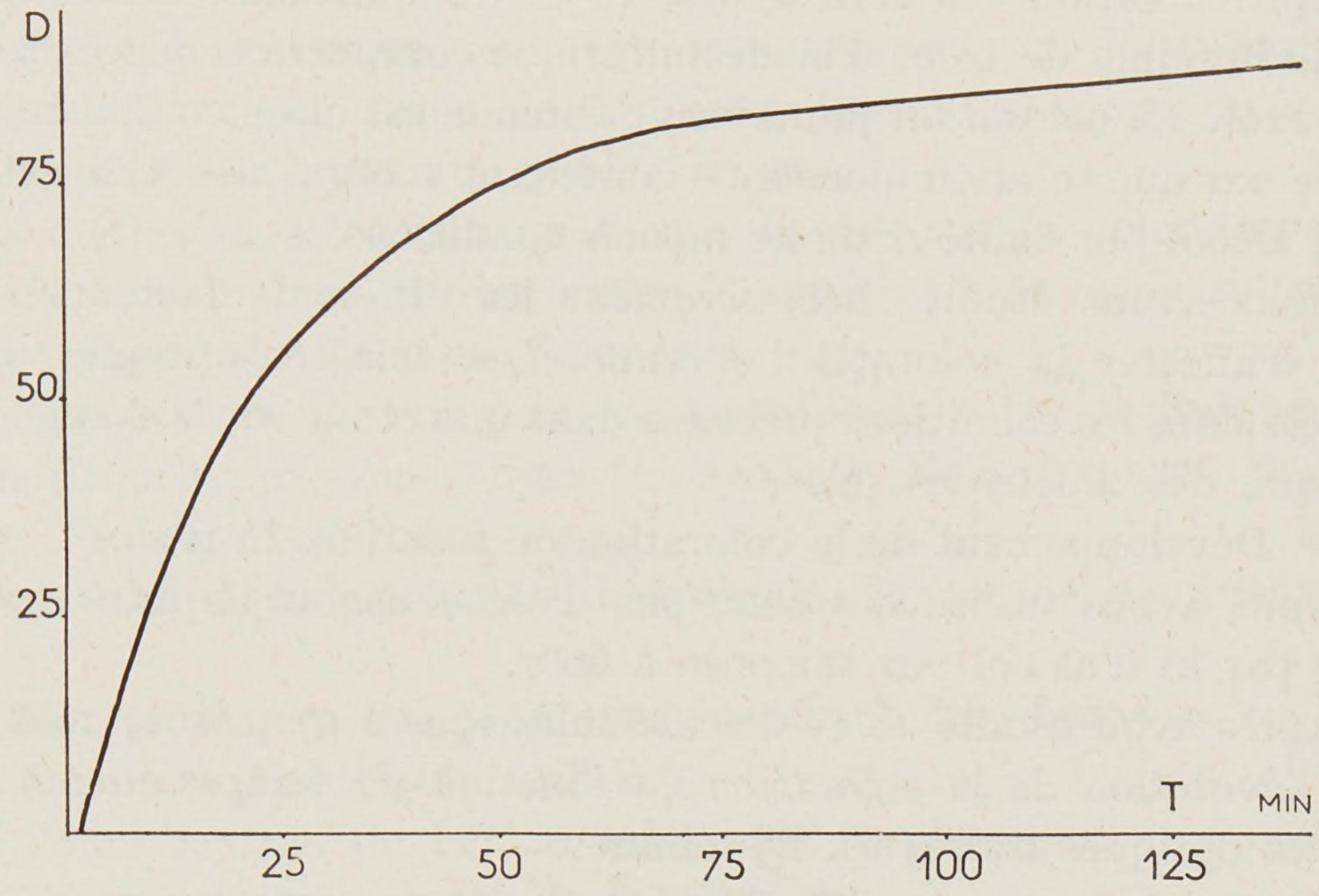


FIG. 1. — Évolution de la coloration en fonction du temps.

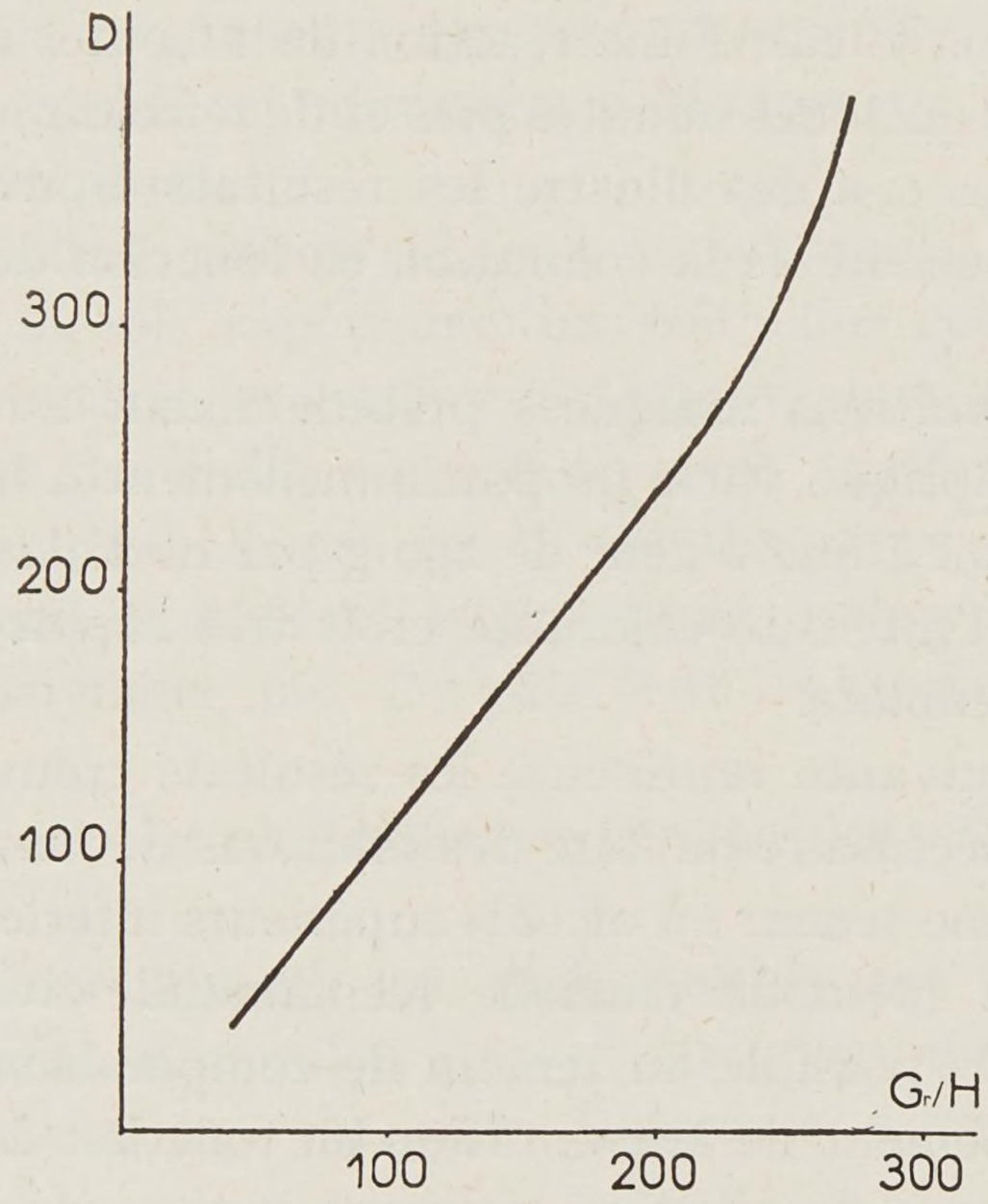


FIG. 2. — Évolution de la coloration en fonction de la teneur en alcools supérieurs.

Déviation à l'électrophotomètre

Températures subies pendant 1 h.	Alcool Isobutylique		
	Solution à 250 γ/cc	Solution à 500 γ/cc	Solution à 1.000 γ/cc
110	39	81	166
120	43	87	174
130	46	92	181

Le graphique suivant illustre les résultats trouvés :

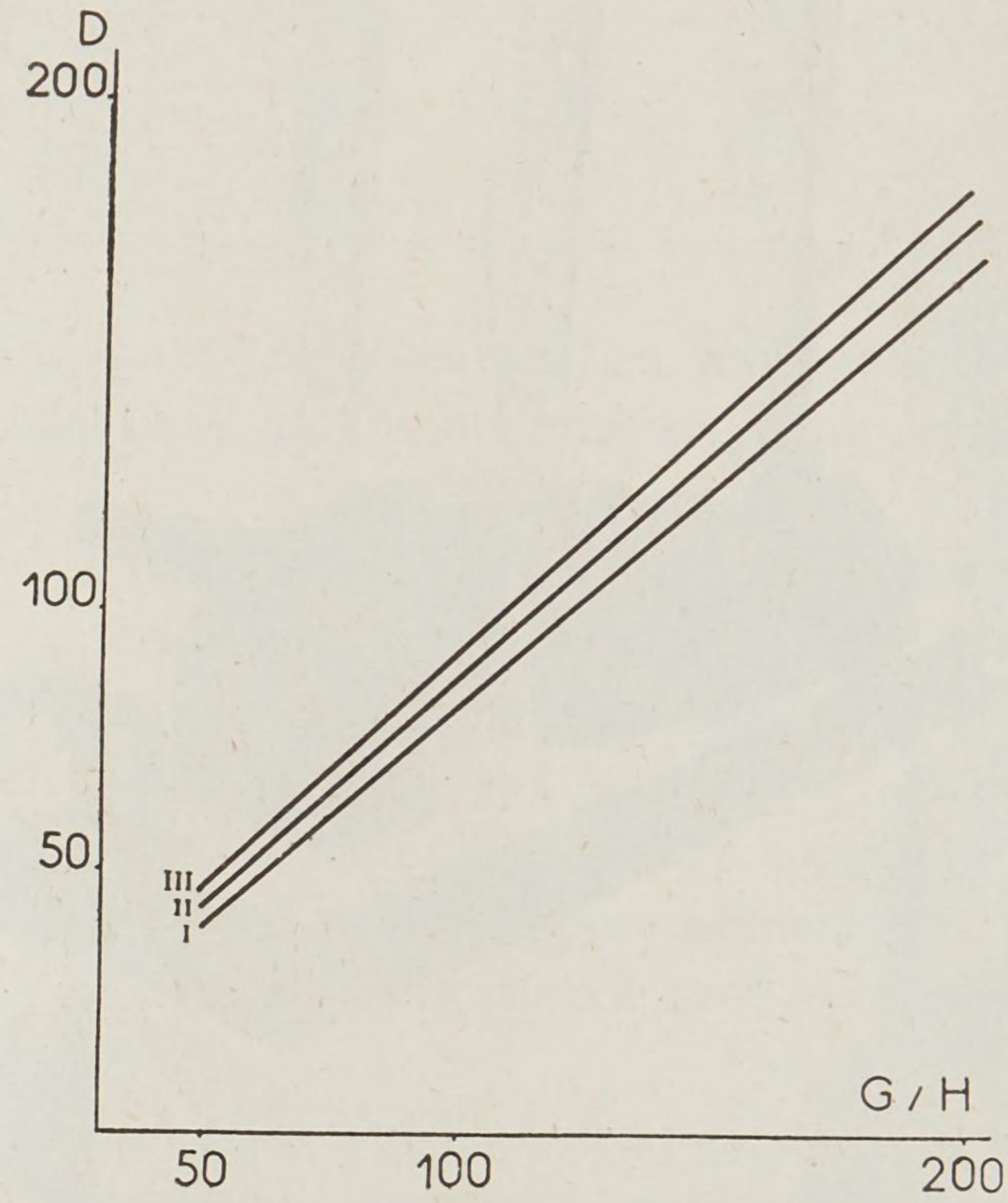


FIG. 3. — I : Température 110°. — II : Température 120°. — III : Température 130°.

Une variation de 2° entraîne une erreur d'environ 1 p. 100. Il convient donc de maintenir avec précision la température de réaction à la valeur voulue. La présence d'un témoin de comparaison n'est pas suffisante pour annuler les effets des variations de température ; en effet, l'influence de la température est plus sensible sur les teneurs élevées que sur les faibles teneurs.

Dans le but de supprimer les variations de température que l'on a avec un bain-marie au Cl_2Ca (la température ne se maintenant à 120° que pour une concentration déterminée de Cl_2Ca qu'il est difficile de conserver), nous avons remplacé ce type de bain-marie par un bain-marie chauffé par résistance interne, rempli de glycérine ou de di-éthylène glycol, dont la température est maintenue stable par un thermostat. Nous l'utilisons depuis plus d'un an. La régulation se fait à $\pm$ 0°5 C près.

Le bain-marie que nous utilisons était parallélipipédique. A la suggestion de Mlle MOROY, noux en avons réalisé un cylindrique qui réalise une homogénéité parfaite de température à l'intérieur du fluide chaud. Une fois réglé, cet appareil ne nécessite pas de surveillance.

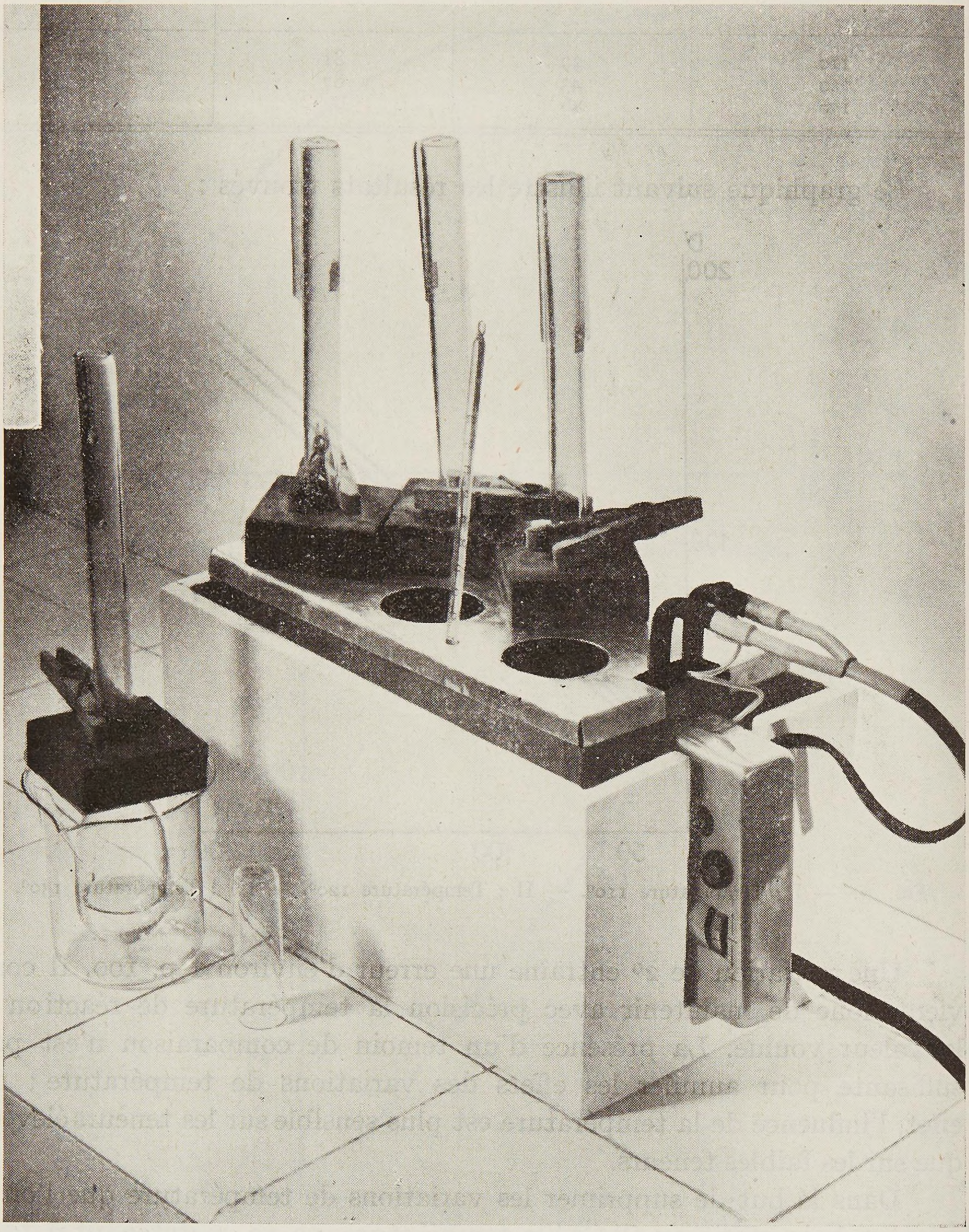


FIG. 4. — Bain-marie au Glycérol.
Chauffage électrique, régulation automatique à 120° par thermostat.

Les matras que nous utilisons pour effectuer la réaction sont recouverts d'un petit couvercle en verre pour éviter l'introduction accidentelle de matière organique.

Plongés aux trois-quarts dans la glycérine, ils sont maintenus par une collerette en bois fixée par une simple pince.

4° Développement de la coloration en fonction de la concentration de l'acide :

Nous avons effectué différentes réactions à 120° avec 10 cc d'acide sulfurique, en faisant varier le titre de ce dernier.

Déviation à l'électrophotomètre

Titre de l'acide sulfur.	Alcool isobutylique		
	Solution à 250 γ/cc	Solution à 500 γ/cc	Solution à 1000 γ/cc
97 %	43	87	174
95 %	42	85	173
90 %	36	81	167
85 %	27	70	159

Les courbes suivantes représentent les résultats trouvés :

La variation du titre de l'acide entraîne une variation très sensible des résultats.

Dans ces conditions, il faudrait opérer avec un acide sulfurique de titre constant et supérieur à 95 p. 100.

Il est donc nécessaire de vérifier l'acide en pesant environ 500 mg de ce dernier et en titrant par la soude normale, chaque fois qu'on change d'acide ; rejeter tout acide dont le titre est inférieur à 95 p. 100.

En outre, l'acide utilisé doit être rigoureusement pur, par conséquent incolore et ne pas entraîner de coloration à 120° avec de l'alcool exempt d'alcools supérieurs.

Il est aussi indispensable d'utiliser des pipettes absolument sèches. Il est également nécessaire de conserver un témoin de comparaison auquel sont ramenées les mesures, même si l'on dispose d'un photocolorimètre :

— Soit D la densité optique correspondant sur la courbe à la teneur de la solution type ayant servi d'étalon.

— Soit D_1 la densité optique donnée réellement par la solution type au moment de l'observation,

soit Δ l'écart entre D et D_1

$$\Delta = D - D_1$$

— Soit *d* la densité optique donnée par la solution alcoolique dont on cherche l'indice isobutylique.

On reportera sur la courbe non la valeur *d* mais la valeur $d + \Delta$.

Cette valeur est :

$$> d \quad \text{si} \quad D > D_1$$
$$< d \quad \text{si} \quad D < D_1.$$

FIG. 5. — Distillation des alcools supérieurs et réception du distillat dans des fioles jaugées rodées.

5° Développement de la coloration en fonction du degré alcoolique.

Toutes choses étant maintenues égales par ailleurs, la densité optique obtenue est d'autant plus forte que le degré alcoolique de la prise d'essai est plus élevé.

6° Fixation des aldéhydes :

Certains aldéhydes donnent une coloration en présence d'acide sulfurique et sensibilisent la réaction avec les alcools supérieurs, il convient donc de les éliminer.

Dans le n° 549-550 des *Annales des Falsifications*, nous avons donné des chiffres montrant que le corps réalisant la meilleure fixation des aldéhydes est le chlorhydrate de métaphénylène diamine.

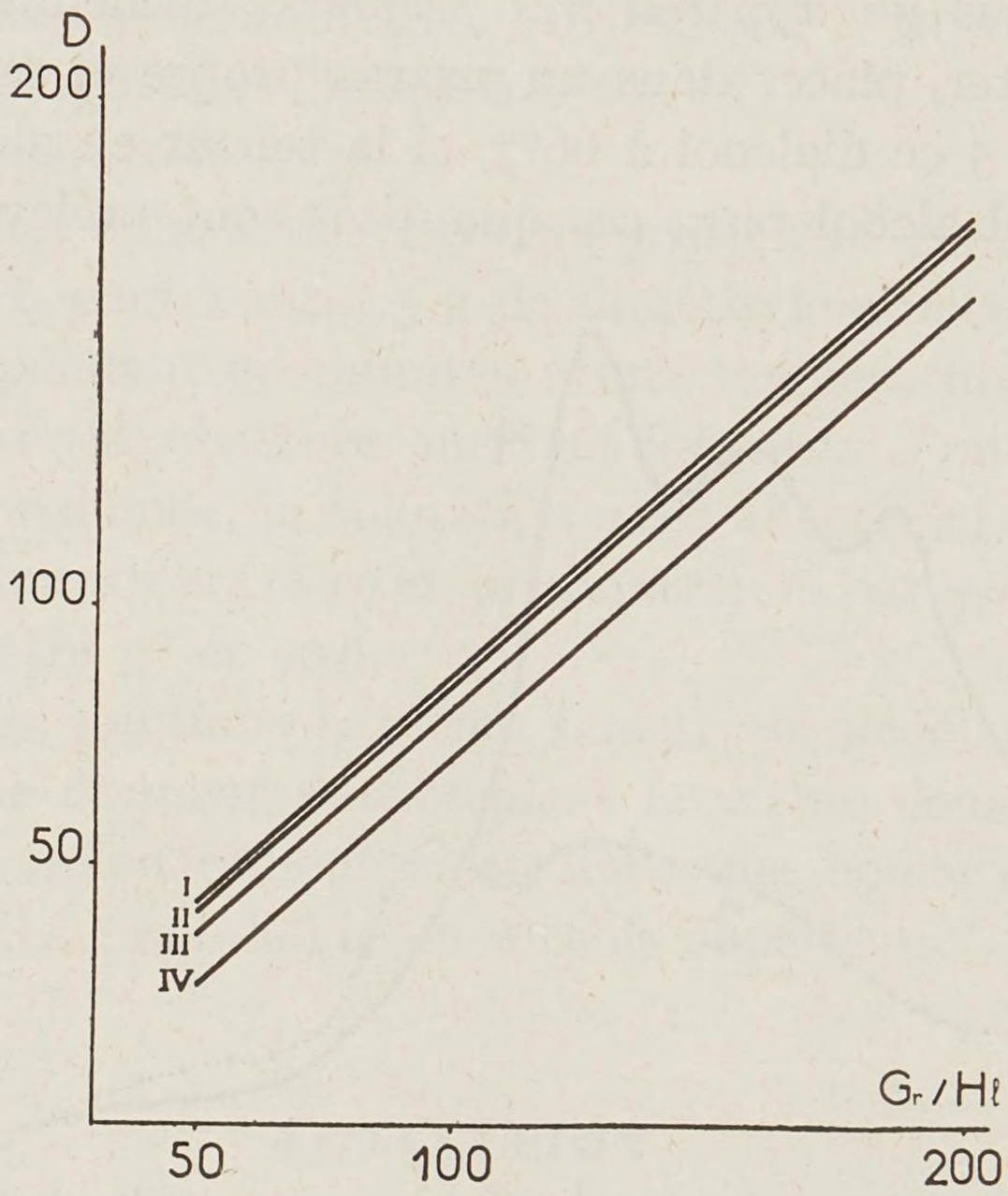


FIG. 6. — I : $SO_4 H_2$: 97 p. 100. — II : $SO_4 H_2$: 95 p. 100. — III : $SO_4 H_2$: 90 p. 100.— IV : $SO_4 H_2$: 85 p. 100.

Il convient d'autre part, d'utiliser des appareils de distillation très propres et de rejeter ceux qui auraient pu servir à distiller des terpènes ou des produits contenant des aldéhydes aromatiques.

La distillation des alcools supérieurs n'offre pas de difficultés, car ceux-ci distillent dans les fractions de tête.

Ethers :

Les éthers d'isoamyle et d'isobutyle réagissent quantitativement pour le poids d'alcool éthérifié correspondant.

Par conséquent, la partie éthérifiée se trouve dosée, comme si elle était libre.

Solution type d'alcool isobutylique :

La méthode officielle recommande de préparer la solution type

avec de l'alcool isobutylique recueilli entre 106°8 et 107°. En réalité, comme l'a fait remarquer le Professeur JAULMES, l'alcool isobutylique bout à 108°1 (10).

Nous avons préparé deux solutions types d'alcool isobutylique, l'une suivant la méthode officielle, l'autre avec de l'alcool isobutylique receuilli à 108°1. Ces deux solutions ont donné la même densité optique après réaction à 120°, avec SO_4H_2.

Dipersion des résultats :

Technique utilisée. — 100 cc d'eau-de-vie ramenée à 50°, avec 1 g de chlorhydrate de phénylène diamine méta (1) sont soumis à légère ébullition au réfrigérant ascendant pendant une heure.

Distiller dans un appareil *très propre* et recueillir 75 cc dans un flacon rodé, agiter, placer dans un matras propre et sec 10 cc (5 cc de prise d'essai + 5 cc d'alcool à 66°7, si la teneur en alcool isobutylique dépasse 200 g/hl alcool pur ; ces quantités sont prélevées avec des pi-

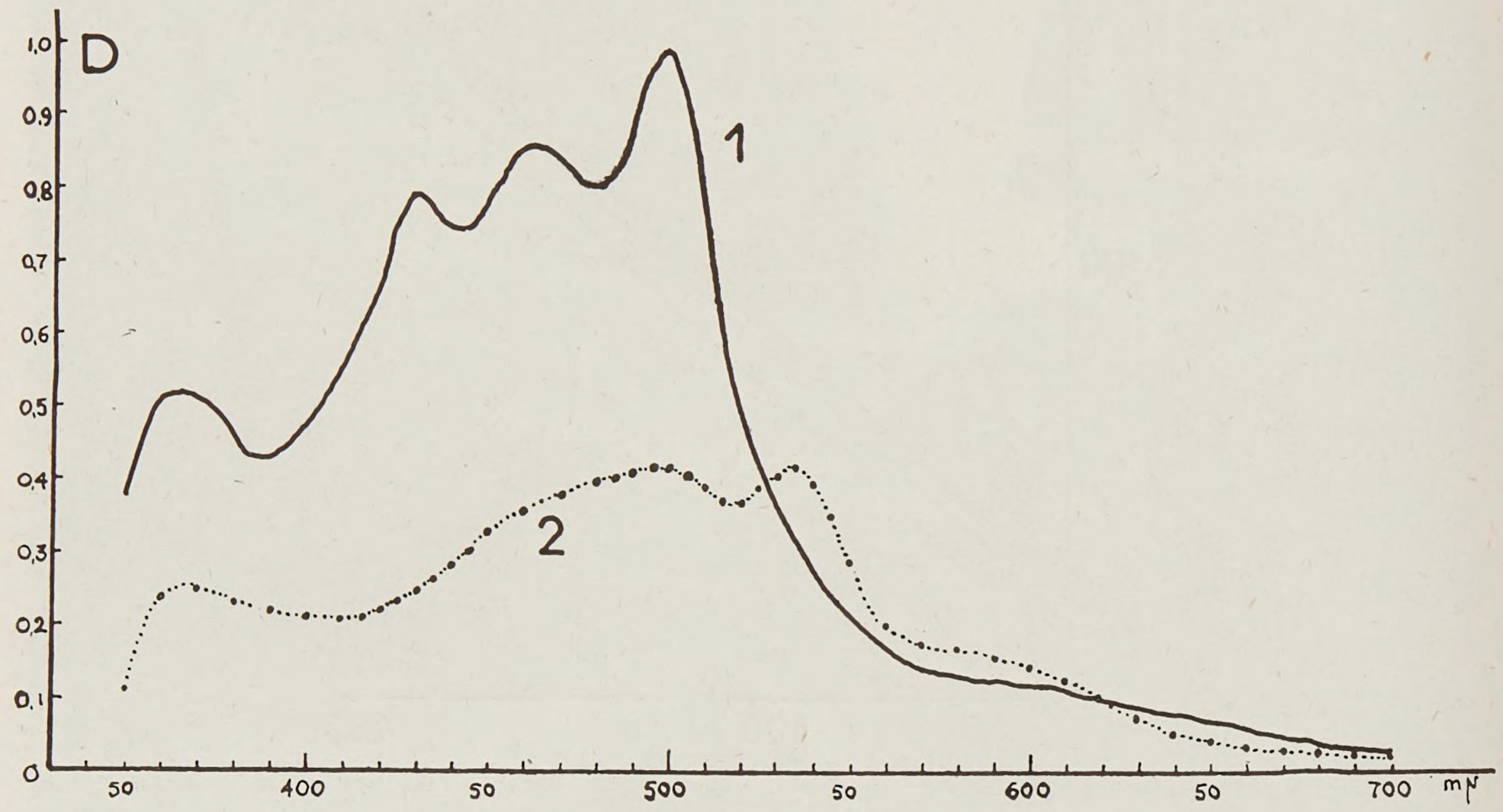


FIG. 7. — Spectre d'absorption (GUYMON-NAKAGIRI) 1. Alcool isobutylique 2. Alcool isoamylique.

pettes de précision double trait bien sèches). Additionner de 10 cc de SO_4H_2 titrant au moins 95 p. 100 et soigneusement contrôlé. Coiffer d'un petit chapeau en verre, agiter, soumettre au bain-marie à la glycérine, à 120° pendant 1 h, observer au photocolorimètre. Reporter sur la courbe établie point par point la valeur $= d + (D\text{-}D_1)$.

Dans ces conditions, comme l'avait signalé M. BONIS, la dispersion des résultats n'est pas considérable.

Tout écart supérieur à 10 p. 100 doit être imputé à une faute de l'opérateur.

(1) Dans le cas où l'eau-de-vie contient plus de 30 gr Éthanal par hl d'alcool pur, il convient d'augmenter la quantité de chlorhydrate de phénylène diamine méta proportionnellement à la teneur en Éthanal.

MÉTHODE KOMAROWSKY

Dans la méthode KOMAROWSKY, l'intensité de la coloration est affectée par les mêmes facteurs que dans la méthode ROCQUES.

Cette méthode n'est pas meilleure que la méthode ROCQUES. On doit seulement signaler, qu'étant plus sensible, elle s'adapte mieux au cas des alcools rectifiés.

GUYMON et NAGAGIRI ont fait subir à la méthode KOMAROWSKY diverses modifications qui en suppriment en grande partie le caractère arbitraire.

Le diméthylaminobenzaldéhyde, utilisé par PENNIMAN a été conservé comme aldéhyde sensibilisateur (11).

Technique opératoire (12) :

1 cc de distillat dont le degré est compris entre 3° et 50°, additionné de 20 cc de SO_5H_2 contenant 0,5 g de diméthylaminobenzaldéhyde par litre, est soumis pendant 20 minutes à une température de 100°.

La coloration est observée sur une longueur d'onde de 520 mμ. Sur cette longueur d'onde, la coloration n'est affectée ni par le temps de réaction (temps compris entre 10 et 30 minutes), ni par le degré alcoolique (degré compris entre 3° et 50°).

En outre, des solutions à même teneur en alcool isobutylique et alcool isoamylique donnent sensiblement la même densité optique.

Il en résulte qu'on obtient ainsi, avec une bonne approximation, la teneur réelle des eaux-de-vie en alcools supérieurs.

CONCLUSION

La méthode ROCQUES, utilisée dans des conditions précises, donne un indice, arbitraire certes, mais assez fidèle et pouvant servir au contrôle. Les quelques précisions de détails que nous avons adoptées la rendent plus sûre et d'un emploi plus commode.

Dans le cas où on utilise cette méthode, au lieu d'exprimer les résultats en alcool isobutylique, il serait souhaitable de donner les résultats sous forme d'un indice appelé par exemple indice isobutylique.

La méthode GUYMON-NAGAGIRI ([1]), moins arbitraire, serait préférable. Elle ne pourrait néanmoins être utilisable qu'après établissement de nouvelles normes.

Utilisée concurremment à la méthode ROCQUES, elle permettrait,

([1]) La méthode GUYMON-NAKAGIRI n'est utilisable que par les laboratoires disposant d'un spectrophotomètre ou d'un photomètre équipé de filtres très sélectifs.

par simple résolution d'un système de deux équations à deux inconnues, de déterminer séparément la teneur des eaux-de-vie en alcool isobutylique et en alcool isoamylique.

Les résultats obtenus avec différentes méthodes n'étant ni identiques, ni convertibles (13), il serait souhaitable, en vue d'éviter des difficultés commerciales, qu'au point de vue international l'accord se fasse sur l'une de ces deux méthodes qui semblent les meilleures pour l'instant.

Nous tenons à remercier M. Michel MARCHÉ, préparateur à la Station Viticole de Cognac, qui nous a secondé avec intelligence et dévouement dans l'exécution de ces essais.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) ORDONNEAU (Ch.). — Le Bouquet des Vins.
(2) HENNIG. — *Bull. off. int. Vin.*, **158,** p. 8, 1943.
(3) CASTOR, GUYMON. — On the mechanism of formation of higher alcohols during alcoholic fermentation *L-Science,* 115-147 (1952).
GENEVOIS (C.). — Formation des alcools supérieurs et leurs dérivés au cours de la fermentation alcoolique, *Ind. Agr. Al.*, **69,** 27, 1952.
(4) MARIA RITA DE LEMOS DE ANDRADE PERES. — Estudo do método oficial Américano para o doseamento dos alcools supériors nosvinhos, *Annales de l'Institut du Vin de Porto,* 1952.
(5) GUYMON (J. F.), NAKAGIRI (J.). — Methods for the determination of fusel oil, *Procedings American Society of Enologist,* **3,** 117, 134, 1952.
(6) ROCQUES (X.). — *Annales de Chimie Analytique,* p. 142, avril 1897.
(7) COLES (H. W.), TOURNAY (W. G.). — The Komasrosky Color reaction for Aliphatic. Alcohols. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, **14,** 20, 2 (1942).
(8) ANDRES (S.), TOURLIÉRE (P.). — Analyse des Alcools, *Industries Agricoles et Alimentaires,* p. 469 (1951).
(9) LAFON (J.), COUILLAUD (P.). — Comparaison de différentes méthodes de dosage des aldéhydes dans les eaux-de-vie. *Ann. Fals. et Fraudes,* juillet-août-septembre-octobre 1954.
(10) TIMMERMANNS. — *Journal de Chimie Physique,* **25,** p. 430, 1928.
(11) PENNIMAN (W. B. D.), SMITH (D. C.), LAWSHE (E.). — Détermination des alcools supérieurs dans les spiritueux. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, **9,** 91, 5, 1937.
(12) GUYMON (J. F.)., NAKAGIRI (J.). — Methods for the determination of fusel oil, *Proceding American Society of Enologist,* **3,** 117, 134 (1952).
(13) KERVEGANT (D.). — Alcools supérieurs, Rhums et eaux-de-vie de canne. Les éditions du Golfe, Vannes, 1946.

DOSAGE ÉLECTROPHOTOMÉTRIQUE DES TRACES DE MANGANÈSE DANS LES MOUTS ET LES VINS

PAR

Mme L. BOUZIGUES et **M. BOUZIGUES**

Station centrale de Recherches sur l'Œnologie, la Cidrerie et les Jus de Fruits, Narbonne

INTRODUCTION

La teneur en manganèse des vins a été étudiée par de nombreux auteurs, qui en dosant cet élément dans les cendres, ont trouvé des chiffres variant entre de larges limites. En 1939, M. FLANZY et L. THEROND (1) ont repris le problème du manganèse en œnologie, en utilisant une méthode dérivée de celle de G. BERTRAND (2) et de CHÉRAMY et LEMOS (3). Ils ont été les premiers à établir une relation entre les chiffres trouvés et la nature du cépage dont les vins étaient issus. Ils ont mis en évidence le caractère analytique particulier de certains vins d'hybrides par rapport à des vins de Vitis Vinifera, en se basant sur la richesse en cet élément. En 1941, M. de ALMEIDA (4) a donné les teneurs en manganèse des vins de porto et M. PEYNAUD (5) a publié en 1947 les résultats qu'il a trouvés dans divers vins des Charentes, du Beaujolais, des Côtes d'Or et du Bordelais.

Les idées modernes que l'on se fait sur les phénomènes d'oxydo-réduction des vins, ont redonné de l'intérêt au dosage de ce corps. Cet élément fait partie du groupe des métaux à valences multiples dont le rôle oligo-dynamique est considérable en tant que système électro-actif du vin. KOTCHERGA (6) le classe au même titre que le fer et le cuivre dans les éléments rédox régulateurs, du fait de l'influence qu'il a sur l'évolution du potentiel d'oxydo-réduction. Pour toutes ces raisons, un procédé de dosage rapide et précis de cet élément peut rendre de grands services en œnologie.

I. — CHOIX D'UNE RÉACTION D'OXYDATION DE L'ION Mn^{+++} EN ION MnO_4^- ET PARTICULARITÉS DE SA COLORIMÉTRIE

A. — Généralités

Le dosage du Mn a été étudié et solutionné dans les aciers et en biochimie (7) par l'*emploi comme oxydant de l'acide périodique en milieu phosphorique*. Ce procédé est supérieur à l'emploi du persulfate d'ammonium en présence de nitrate d'Ag.

En effet, les inconvénients de ce dernier sont : le manque de stabilité des solutions de MnO_4^- obtenues, formation de bulles d'oxygène sur les parois des cuves colorimétriques, formation d'un précipité de ClAg avec les traces de chlorures des réactifs, formation d'une coloration avec d'autres cations, par exemple, avec le Titane (8). L'avantage de l'oxydation par le périodate est que les solutions obtenues sont *stables*.

Au moyen du périodate on oxyde Mn^{+++} en MnO_4^- ; l'addition de PO_4H_3 empêche la précipitation d'oxyde et de périodate de Mn, et éventuellement de périodate ferrique, décolore la solution ferrique et stabilise MnO_4^-. On peut opérer en milieu nitrique ou sulfurique.

La colorimétrie de l'ion MnO_4^- constitue une méthode de dosage convenant particulièrement à l'évaluation des traces de ce corps. Elle est à la fois sensible, précise et spécifique. Le graphique 1 donne les variations du coefficient d'extinction moléculaire du permanganate, en fonction de la longueur d'onde. On distingue nettement une mince bande d'absorption maximum vers 500 à 570 mμ. Les deux valeurs maximum de ε sont 2 420 à 546 mμ et 2 230 à 520 mμ. On peut encore doser jusqu'à 200 γ de manganèse par litre et la précision n'est limitée que par celle de l'appareil spectrophotométrique. Charlot et Gauguin (*op. cit.* (8)) signalent que celle-ci peut atteindre 0,3 p. 100 avec certains appareils à écrans.

B. — Travaux personnels. Recherches sur la stabilité de la coloration

Nos premiers essais ont été effectués dans le but d'éprouver la stabilité de la coloration obtenue et de vérifier si la loi de Beer est suivie régulièrement. Nous sommes partis d'une solution étalon de sulfate de Mn, telle que 20 ml correspondent à 500 γ de ce corps. A partir de cette solution mère, nous avons préparé 3 solutions contenant respectivement 50, 100 et 250 γ dans un ballon de 50 ml, auxquelles nous avons ajouté 10 ml de NO_3H pur, 5 ml de PO_4H_3 et 0 g, 2 de IO_4K.

Les ballons ont été portés au bain-marie bouillant pendant 10 minutes.

Les essais ont été effectués en double, et parallèlement on faisait un essai à blanc. Après refroidissement, nous avons complété à 50 ml avec de l'eau distillée et examiné au photocolorimètre BONET et MAURY, filtre 13, sous 10 mm d'épaisseur.

Voici les résultats obtenus :

Mn en γ/50ml	Essais	D. O.	D. O. corrigée	D. O. (2 heures après)
	T′	4,95		4,3
	T″	4,95		4,3
50	I 1	7,9	3,05	7,5
50	I 2	7,95	3	7,5
100	II 1	11	6	10,8
100	II 2	11,05	6,1	10,5
250	III 1	20,3	15,35	19,8
250	III 2	20,1	15,15	19,8

On peut constater que les 3 points portés sur des coordonnées rectangulaires déterminent une droite, mais la coloration n'est pas très stable.

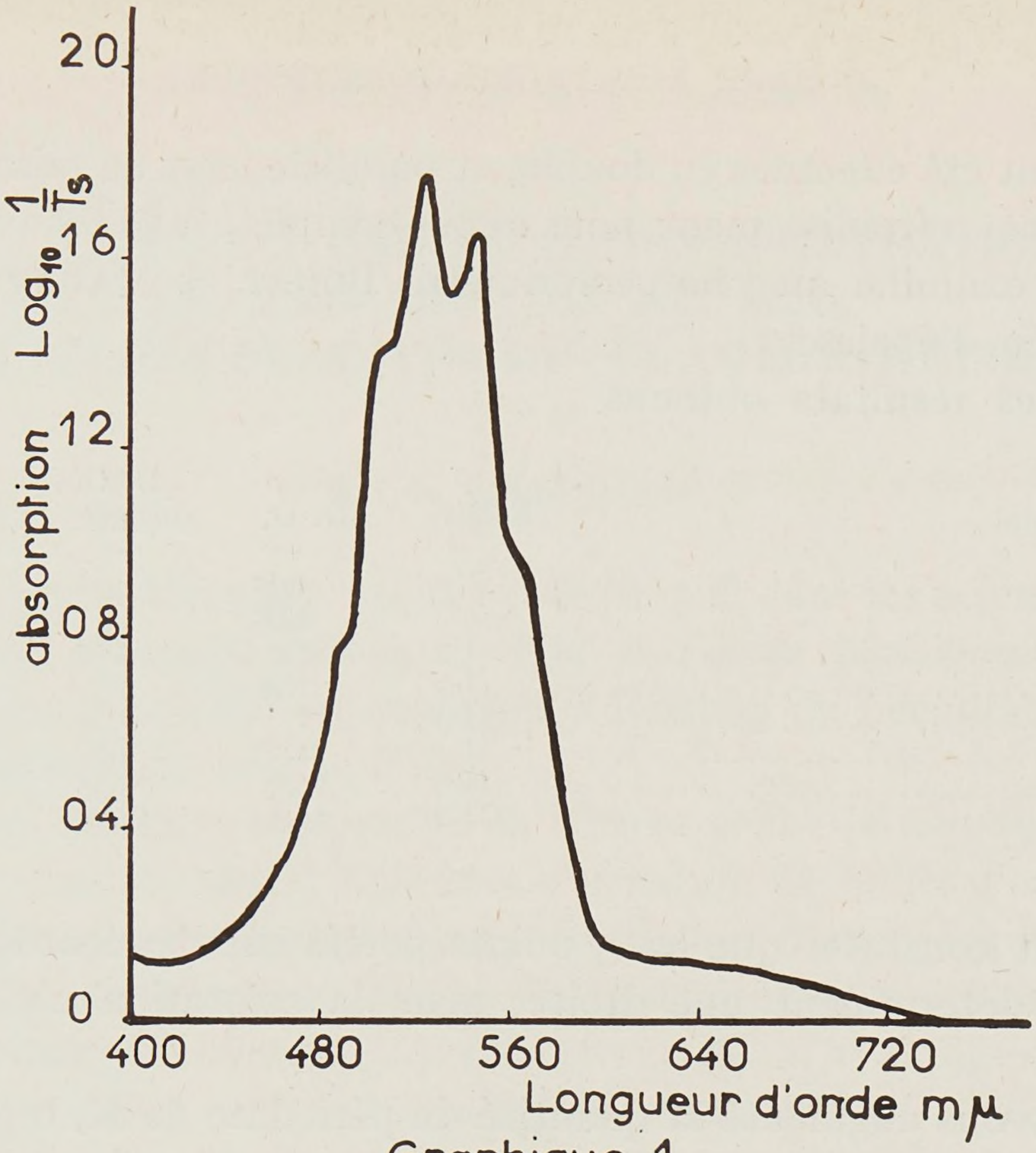
Nous avons augmenté la quantité de périodate de K, 0 g, 5 au lieu de 0 g, 2, et essayé l'acide sulfurique. Nous avons préparé à partir de la solution mère, une gamme étalon plus complète contenant 0 mg, 250, 0 mg, 500, 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg de Mn par litre.

A 10 ml de la solution de Mn dans un ballon de 50 ml, on ajoutait 10 ml de SO_4H_2, 5 N, 0 g, 5 de périodate de K, 2 ml, 5 de PO_4H_3 et 10 ml d'eau distillée.

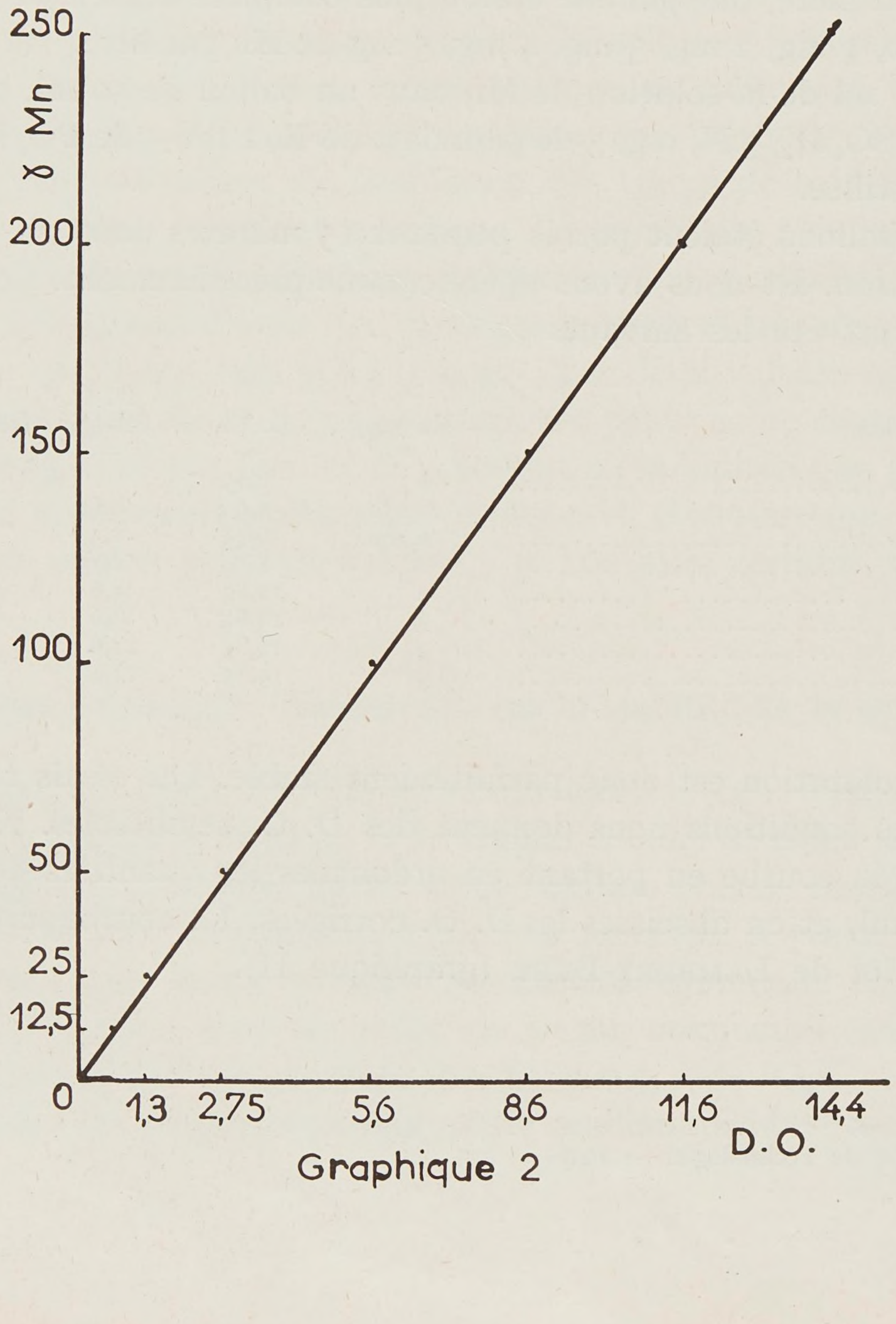
Les ballons étaient portés pendant 15 minutes dans un bain-marie à l'ébullition. Et nous avons opéré comme précédemment. Les résultats obtenus ont été les suivants :

Échantillon	Mn mg/l	D. O.	D. O. corrigée	D. O. (16 h après)
T	0	5,25		5,2
1	0,250	5,9	0,65	5,9
2	0,500	6,55	1,3	6,55
3	1	8	2,75	8,2
4	2	10,85	5,6	11,05
5	3	13,85	8,6	13,9
6	4	16,85	11,6	16,95
7	5	19,65	14,4	19,7

La coloration est donc parfaitement stable. Les essais refaits dans les mêmes conditions nous donnent des D. O. semblables. Nous avons construit la courbe en portant en ordonnées les quantités de Mn en γ dans 50 ml, et en abscisses les D. O. corrigées. La courbe suit régulièrement la loi de LAMBERT-BEER (graphique II).



Graphique 1



Graphique 2

II. — MINÉRALISATION DU VIN ET ÉTUDE DE SON ACTION SUR LA RÉACTION COLORIMÉTRIQUE PRÉCÉDENTE

A. — Minéralisation humide par le couple NO_3H-perhydrol

L'un de nous, en collaboration avec L. DEIBNER, a fait une étude sur la destruction des substances organiques des vins rouges par l'eau oxygénée, en présence d'acides minéraux.

Nous avons utilisé ce mode opératoire et étudié son influence sur l'oxydation du Mn en MnO_4^-. 50 ml de vin évaporés au demi pour chasser l'alcool ont été additionnés de 10 ml d'acide nitrique concentré, et 20 ml de perhydrol à 110 volumes. On évapore presque à sec et on reprend le résidu par 10 ml de NO_3H et 10 ml de perhydrol. Après l'évaporation, et la décomposition des nitrates, on obtient un résidu blanc. La minéralisation complète ne peut être obtenue qu'en exécutant l'oxydation en 2 stades pour les vins secs, et plus pour les vins sucrés. Dans le cas du Mn, nous devons obtenir un résidu complètement débarrassé de toutes traces de matières organiques, afin de ne pas réduire MnO_4^- et d'éviter d'obtenir une erreur systématique par défaut.

Nous avons fait plusieurs essais de minéralisation à partir du même vin. L'oxydation du Mn telle que nous l'avons décrite précédemment, a été faite dans les matras où a eu lieu la minéralisation.

Les résultats ont été les suivants :

	D. O.	D. O. (16 h après)
T	5,25	5,25
1	7,3	7,4
2	7,3	7,4
3	7,35	7,43
4	7,3	7,4

On peut donc affirmer que la coloration est stable, et que l'oxydation du Mn ne paraît pas perturbée par la minéralisation.

Lors de nos premiers essais de minéralisation, nous avions obtenu une coloration fugitive avec l'un des échantillons qui n'était pas très blanc. Une trace de substance organique non oxydée avait réduit MnO_4^- formé. Pour obtenir une coloration stable et des résultats précis, il est donc nécessaire d'avoir un résidu très blanc sans aucune trace de matière charbonneuse.

La longueur des essais de minéralisation nitro-perhydrol sur vins sucrés, nous a conduits à étudier une méthode plus rapide. Nous avons pensé à la destruction sulfo-nitro-perchlorique selon la technique de KAHANE (9).

Des essais comparatifs sur vins sucrés (150 gr/1 de sucre) nous ont

amenés à conclure que l'acide perchlorique permet d'obtenir une destruction plus rapide des matières organiques, mais que la manipulation de cet oxydant nécessite de grandes précautions.

Nous avons rejeté, bien que plus rapide, ce moyen de destruction d'autant plus que E. KAHANE et D. BRARD (10) ont montré que le volume énorme de vapeurs émises au cours de la destruction, amène une perte par volatilisation de certains sels métalliques,en particulier de chrome et de Manganèse.

B. — **Incinération**

Nous avons effectué des essais comparatifs de dosage du Mn après destruction des matières organiques par voie humide et par voie sèche.

Le dosage du Mn après incinération du vin se fait de la même manière ; on reprend les cendres du vin par l'acide sulfurique 5 N, le périodate de K et $PO_4 H_3$, on porte au bain-marie 15 minutes.

Nous avons comparé le dosage du Mn dans 2 vins, en utilisant la minéralisation humide et la minéralisation sèche.

Pour l'obtention des cendres, nous avons utilisé des capsules de Pt.

Les résultats des essais ont été les suivants :

	Essais	D. O.
Cendres	1	7,4
	2	10,3
Minéralisation	1	7,3
Humide	11	10,35

Les résultats sont identiques, l'avantage de la minéralisation humide réside dans une plus grande rapidité d'exécution.

Nous devons signaler qu'avec les échantillons de vins utilisés, nous n'avons eu aucune difficulté pour obtenir des cendres blanches ; ce qui n'est pas toujours le cas, en particulier pour les vins riches en sucre.

III. — APPLICATION DE L'OXYDATION PÉRIODIQUE AUX CENDRES OBTENUES PAR LA MINÉRALISATION HUMIDE A L'AIDE DU MÉLANGE PERHYDROL-ACIDE NITRIQUE.

A. — **Essais sur des vins synthétiques secs et sucrés**

Nous avons utilisé un vin artificiel selon la technique de MARIGNAN (11). A partir de cette liqueur, nous avons préparé 4 solutions contenant respectivement : 0 mg, 250, 1 mg, 2 mg, 5 mg, de Mn par litre. Le Mn a été dosé par oxydation périodique sur les cendres obtenues, après minéralisation humide. A partir des densités optiques absolues, nous avons déduit sur la courbe étalon (graphique II) les quantités de

Mn correspondantes, et en tenant compte des dilutions, remonté à la teneur de l'échantillon en mg par litre.

Échantillons	D. O.	D. O. c.	Mn trouvé mg/l	Mn ajouté mg/l	Erreur %
T	5,2				
1	5,8	0,6	0,220	0,250	— 12
2	7,95	2,7	0,960	1	+ 4
3	11,1	5,9	2,06	2	+ 3
4	19,4	14,2	4,94	5	— 1,2

Les erreurs observées sont inférieures à 5 p. 100 jusqu'à une teneur minimum en Mn de l'ordre de 500 γ, au-dessous, les erreurs sont plus élevées. Dans le cas de teneurs en Mn inférieures à 500 γ/l, il est préférable de travailler sur une prise d'essai plus élevée, ce qui allongera légèrement la durée du traitement oxydatif (destruction des matières organiques).

Pour le dosage du Mn dans les vins synthétiques sucrés, on a de même préparé 4 solutions à partir de la même liqueur enrichie en glucose et en Mn.

Les échantillons avaient la composition suivante :

Échantillons	Glucose g/l	Mn mg/l
I	200	0,500
II	200	3
III	150	4
IV	100	2

Pour obtenir une minéralisation plus rapide,dans le cas des vins sucrés, nous avons pris 25 ml de solution au lieu de 50 ml.

Nous avons constaté qu'après trois ou quatre traitements oxydatifs ($NO_3 H + H_2 O_2$) selon la teneur en sucre, l'addition de quelques gouttes de $H_2 O_2$, seule, si le résidu est encore jaune, chasse les nitrates et permet l'obtention d'un résidu parfaitement blanc.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Échantillons	D. O.	D. O. c.	Mn trouvé en mg/l	Erreur %
T	5,25			%
I	6	0,75	0,520	+ 4
II	9,6	4,35	3,02	+ 0,65
III	10,9	5,65	3,92	— 2
IV	8,15	2,80	1,960	— 2

Comme pour les vins secs, les erreurs sont inférieures à 5 p. 100. Seul le traitement minéralisant allonge d'une à deux heures, le dosage.

B. — **Essais sur des vins secs et sucrés et sur des jus de raisins**

Les essais ont porté sur une variété de vins : un Corbières 1954, un Tuchan 1952, un Muscadet Liré 1951 et un vin de Noah. Ces différents échantillons ont été enrichis de 1 mg par litre.

Les résultats ont été les suivants :

Échantillons	Enrichissement mg Mn/l	Mn mg/l trouvé
	mg	mg
Corbières 1954	0	1,03
	+ 1	2,04
Tuchan 1952	0	0,35
	+ 1	1,4
Muscadet Liré 1951	0	2,15
	+ 1	3,1
Noah	0	3,9
	+ 1	5

On peut constater que la quantité de Mn ajouté a été retrouvée toujours avec une erreur inférieure à 5 p. 100. D'autre part, les teneurs en Mn de ces différents échantillons, correspondent à celles trouvées par M. Flanzy et L. Therond.

Le dosage du Mn dans quelques jus de raisins et vins sucrés, a donné les résultats suivants :

Échantillons	Mn trouvé mg/l
	mg
Moût d'hybride (concord) :	
1	2,28
2	2,36
3	2,32
Moût d'aramon	1,04
V.D.N. (grenache et macabeu)	1,52
V.D.N. (grenache rouge) Villeneuve-les-Corbières	1,08
V.D.N. Estagel	0,800
V.D.N. Tuchan	0,640

Le traitement de destruction des matières organiques, a été fait en trois fois ; à la dernière, on n'a ajouté que 5 ml $NO_3 H$ + 5 ml $H_2 O_2$. Le dosage a duré environ 1 heure de plus que pour les vins secs.

Nous avons dosé certains de ces échantillons après les avoir enrichis de Mn. Voici les résultats :

Échantillons	Enrichissement Mn mg/l	Mn trouvé mg/l
	mg	mg
Moût d'aramon	+ 1	2,100
Moût d'hybride	+ 1	3,4
V.D.N. (grenache rouge)	+ 10	11
V.D.N. Estagel	+ 5	6
V.D.N. Tuchan	+ 5	5,250

IV. — PROCÉDÉ PROPOSÉ ET PRÉCISION OBTENUE

A. — Description du nouveau procédé de dosage du Mn

a) Principe

Le dosage du Mn comprend trois parties :

1° destruction des matières organiques du vin par minéralisation humide ;

2° oxydation du résidu afin de transformer $Mn^{+++} \rightarrow MnO_4^-$;

3° examen photocolorimétrique des colorations obtenues.

b) **Mode opératoire**

1° Introduire dans un ballon Kjeldahl de 100 ml de capacité 50 ml de vin. Évaporer au bain de sable pour chasser l'alcool. Ajouter 10 ml de NO_3H et 20 ml d'eau oxygénée à 110 volumes. Retirer les matras du bain de sable pendant quelques minutes, au moment où la réaction se déclenche ; évaporer presqu'à sec ; si le vin contient peu ou pas de sucre, reprendre le résidu par 5 ml d'acide nitrique et 10 ml d'eau oxygénée ; évaporer à sec jusqu'à l'obtention d'un résidu parfaitement blanc. En général, dans le cas des vins secs, le résidu blanc est obtenu au bout de deux traitements ; trois ou quatre sont nécessaires dans le cas des vins sucrés.

2° Reprendre le résidu par 10 ml de SO_4H_2, 5N ; chauffer à feu nu afin de faciliter la dissolution ; ajouter ensuite 0 g, 500 de périodate de potasse, 2 ml, 5 d'acide ortho-phosphorique, et 10 ml d'eau distillée pour nettoyer les parois du matras. Porter au bain-marie bouillant pendant 15 minutes. Faire un essai à blanc dans les mêmes conditions. Après refroidissement, transvaser dans un ballon de 50 ml et compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée.

3° Examiner les colorations obtenues au photocolorimètre Bonet et Maury, en utilisant le filtre vert 13 (absorption 530 mμ) et la cuve de 10 mm. A partir des densités optiques absolues, déduire sur la courbe étalon les quantités de Mn correspondant et en tenant compte des dilutions, remonter à la teneur de l'échantillon en mg par litre.

B. — **Précision de la méthode**

Nous entendons par « précision » *la fidélité* des résultats obtenus et leur exactitude par rapport à la valeur vraie.

Pour exprimer la fidélité, nous avons appliqué la méthode statistique des petits nombres, à une série de résultats obtenus en choisissant au hasard 10 nombres parmi un ensemble d'essais exécutés sur un vin synthétique sec contenant exactement 1 mg par litre de Mn, teneur moyenne rencontrée dans le plus grand nombre de vins.

On a calculé successivement la moyenne arithmétique de la série $\bar{x} = \frac{\Sigma x}{n}$ puis la variance $S = \sqrt{\frac{\Sigma(\bar{x} - x)^2}{n - 1}}$ ou écart-type de chaque mesure, enfin l'écart-type $S' = \frac{S}{\sqrt{n}}$ de la moyenne de n mesures. Le coefficient de Fisher a été choisi pour une probabilité de 0,05 et un nombre d'essais de 10. Les tables à double entrée ont dans ces conditions, donné le chiffre de $t = 2{,}262$.

On a :

x	$\bar{x} - x$	$(\bar{x} - x)^2$
1,020	0,019	0,000361
1,020	0,019	0,000361
1,020	0,019	0,000361
1,012	0,011	0,000121
0,980	0,021	0,000441
0,976	0,025	0,000625
0,976	0,025	0,000625
0,976	0,025	0,000625
1,050	0,049	0,002401
0,980	0,021	0,000441

On a pour l'écart-type de chaque mesure $S = \sqrt{\frac{\Sigma(\bar{x} - x)^2}{n - 1}} = 0,02658$

$S' = \frac{S}{\sqrt{10}}$ est la valeur de l'écart-type sur la moyenne.

La vraie valeur μ à 95 p. 100 de chances d'être comprise entre

$$\mu = x \pm S't = 1,001 \pm 2,2620 \times 0,084 \quad \text{soit} \quad 0,982 \leqslant \mu \leqslant 1,02$$

avec une fidélité pour 10 mesures de $\pm$ 1,89 p. 100 $\left(\pm \frac{0,019 \times 100}{1.001}\right)$.

D'autre part, toute mesure a 95 p. 100 de chances de se trouver dans les limites définies par

$$x = \bar{x} \pm St = 1,001 \pm 0,0601 \text{ soit } 0,941 \leqslant 1 \leqslant 1,061$$

Tous les chiffres examinés sont dans ces limites, donc la méthode n'est pas entachée d'une erreur systématique importante, ce qui justifie le mode de calcul précédent.

La fidélité d'une mesure individuelle est de l'ordre de $\pm$ 6 p. 100. L'exactitude est l'écart entre la vraie valeur V et la valeur trouvée pour vraie μ. On a donc dans les cas extrêmes :

$$1 - 0,982 = 0,018 \quad \text{soit} \quad - 1,8 \text{ p. } 100$$

et

$$1,02 - 1 = 0,02 \quad \text{soit} \quad + 2 \text{ p. } 100.$$

On peut donc dire que pour 10 essais effectués, la méthode a 95 chances sur cent d'être exacte à $\pm$ 2 p. 100 près. Toutes valeurs comprises entre ces limites sont dépourvues de signification.

CONCLUSION

La méthode de dosage du Mn qui vient d'être décrite, permet de déterminer avec précision, des traces de ce corps dans les moûts et les vins.

Notre étude met en évidence les quatre points suivants :

1° Le traitement oxydatif par voie humide des vins et des moûts permet d'obtenir plus rapidement que par l'incinération directe, les sels de manganèse minéraux.

2° L'oxydation du Mn bivalent en anion permanganique, par le périodate en milieu sulfo-phosphorique produit des colorations stables indéfiniment, et de coefficient moléculaire constant sous une longueur d'onde déterminée.

3° L'emploi d'un spectrophotomètre pour la colorimétrie de l'ion permanganique convient parfaitement et permet un dosage très spécifique du manganèse.

4° Dans les conditions d'emploi de la méthode que nous proposons, les essais au photocolorimètre BONET et MAURY étudiés par la méthode statistique des écarts, montrent que le procédé est exact à ± 2 p. 100 près pour une concentration en Mn supérieure à 500 γ par litre.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) FLANZY (M.) et THÉROND (L.). — Le manganèse dans les vins de Vitis vinifera et les vins d'hybrides. *Rev. de Viti.*, **90,** 433-454, 1939.

(2) BERTRAND (G.). — Recherches et dosage de petites quantités de manganèse en particulier dans les substances organiques. *Bull. Soc. Chim.*, 4e série, **9,** 361, 1911.

(3) CHÉRAMY (P.) et LEMOS (A.). — Sur le dosage de petites quantités de manganèse dans les produits œnologiques. *Journ. de Pharm. et de Chim.*, 8e série, 25, 17, 1937.

(4) DE ALMEIDA. — *Anais. Inst. Vinho Porto,* 233-1941.

(5) RIBÉREAU-GAYON (J.) et PEYNAUD (E.). — *Analyse et contrôle des vins,* p. 716-729, 1947.

(6) KOTCHERGA. — *Chimie du Vin,* 204, 1951.

(7) COOK (J. W.). — Rapid Method for determination of Mn in Foods. *Ind. Eng. Chem.* Abral. Ed., 13-48, 1941.

(8) CHARLOT (G.) et GAUGUIN (R.). — Dosages colorimétriques. Éd. Masson et Cie, p. 177, 1952.

(9) KAHANE (E.). — Destruction de quantités importantes de matières organiques au moyen de l'acide perchlorique. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 294-305, 1932.

(10) KAHANE (E.) et BRARD (D.). — Application de la méthode nitro-sulfo-perchlorique de destruction des matières organiques à l'étude du Cr et du Mn. *Bull. Soc. Chim. Bio.*, **16,** 710-719, 1934.

(11) MARIGNAN (R.). — Le dosage de l'acide succinique dans les vins. Thèse, Pharmacie, Montpellier, p. 112, 1944.

SUR L'EMPLOI D'UNE BACTÉRIE THERMOPHILE POUR UN DOSAGE RAPIDE DE LA NISINE

PAR

P. RAIBAUD

Station Centrale de Microbiologie et Recherches laitières
(Jouy-en-Josas)

Au cours de recherches entreprises sur le rôle et l'emploi en fromagerie de la nisine produite par certaines souches de *Streptococcus lactis*, nous avons été amenés à considérer le problème du dosage de cet antibiotique, déjà étudié par différents auteurs (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8), sous l'angle de la rapidité et de la simplicité. Dans une étude de ce genre, un procédé permettant une réponse rapide, pour ainsi dire extemporanée, mais cependant suffisamment précise, présente en effet le plus haut intérêt. Or les méthodes dont nous disposons actuellement pour le dosage de la nisine sont toutes des méthodes microbiologiques soumises aux contingences habituelles des techniques bactériologiques : culture entre 30° et 40° des organismes-test sur des milieux parfois complexes, stérilité du matériel et asepsie des manipulations.

Pour essayer de pallier ces inconvénients, il nous a paru intéressant d'envisager l'utilisation comme organisme-test d'une bactérie thermophile : une température optima de croissance élevée réalise en effet une sélection naturelle qui, diminuant les risques d'une contamination éventuelle de l'organisme-test par d'autres germes, permet de réduire ou même de supprimer les conditions de stérilité des milieux de culture et l'asepsie des manipulations. D'autre part le taux de croissance élevé qui caractérise ces organismes thermophiles assure dans un dosage microbiologique une réponse rapide. Enfin ces bactéries présentent souvent une croissance excellente dans des milieux simples, à base de peptone et de glucides.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'organisme-test

La souche que nous avons utilisée a été isolée selon la technique décrite par GUITTONNEAU (9) : on ensemence 1g environ de fumier ou d'ensilage dans 100 ml du milieu suivant :

Saccharose (sucre du commerce).....	30 g
Peptone Prolabo	15 g
Eau du robinet.....	qs 1 000 ml

pH ajusté à 8,2 avec de la soude.

Pour éviter une acidification trop rapide, on sature de carbonate de chaux le flacon destiné à l'isolement. Après 18 heures d'incubation à 68°, un fort dégagement gazeux s'est établi. On fait alors un isolement sur boîtes de PETRI contenant le milieu précédent gélosé à 20 p. 1 000, et maintenues à 50-55°, puis un repiquage massif des colonies sur milieu liquide.

La bactérie isolée est un bâtonnet Gram positif, aérobie, saccharolytique. La figure 1 montre que, pendant la phase logarithmique de croissance, la formation d'acide lactique aux dépens du saccharose abaisse le pH du milieu de culture de 0,25 $\pm$ 0,02 unités pH en 5 minutes d'incubation.

La température optima de croissance, 68°, les caractères morphologiques et culturaux, la forme et les conditions d'apparition des spores correspondent à la description donnée par GUITTONNEAU (9) de *Thermobacillus tarbellicus*.

La croissance au cours des repiquages en milieu liquide est fortement influencée par le pH initial du milieu, comme le montre la figure 2. On voit l'intérêt d'ajuster ce pH à 8,0-8,2 pour que se développe ensuite une acidité suffisante dans le milieu de culture.

D'autre part cette bactérie peut manifester au cours de sa croissance une phase de latence dont l'importance est très variable. Elle est considérablement allongée par un simple refroidissement momentané à la température du laboratoire, et plus encore par le séjour à la glacière du milieu ensemencé. Une dose d'inoculation trop faible dans un repiquage est aussi une cause provoquant l'apparition d'une phase de latence prolongée. Il faut en tenir compte au cours des repiquages : dans un milieu ensemencé à 10 p. 100 avec une culture en fin de phase logarithmique, n'ayant subi aucun refroidissement, la phase de latence est très courte, et la phase logarithmique commence après 30 minutes, environ ,d'incubation à 68°. Mais lorsqu'on utilise pour les repiquages une culture conservée à la glacière, la phase de latence peut atteindre 6 heures. Si l'on veut disposer d'une culture bien développée le matin, il faut donc faire

incuber le milieu, ensemencé à 10 p. 100, au moins pendant 6 heures ; pour cela, il suffit de déclencher le chauffage d'un petit bain-marie à 68° au moyen d'un chrono-relais.

La souche de *Thermobacillus tarbellicus* se conserve bien à la glacière, en milieu additionné de carbonate de chaux.

Milieu de dosage

Pour le dosage on utilise le milieu d'isolement sans carbonate. Il est préparé extemporanément, sans filtration ni stérilisation. La figure 3 montre que, si l'on ajoute à un volume déterminé de ce milieu des quantités connues d'acide lactique, les variations du pH sont les plus importantes entre pH 6,8 et 5,0, et que dans cette zone le pH est fonction linéaire du logarithme de la concentration en acide lactique.

Matériel

Nous utilisons des tubes de 18 × 180 qu'il n'est pas nécessaire de stériliser avant usage. Il faut, par contre, les laver à la soude selon la technique préconisée par BERRIDGE (7), et les rincer soigneusement à l'eau distillée. L'incubation se fait dans un grand bain-marie pouvant contenir plus de 100 tubes, réglé à 68° ± 0°,1 et convenablement agité pour assurer l'uniformité de la température.

Sources de nisine

Nos essais de dosage ont été effectués à partir de cultures sur lait de *Streptococcus lactis*, souche X 13. La culture est portée rapidement — en 5 minutes environ — à l'ébullition pendant 30 secondes, selon la technique de BERRIDGE (8), refroidie aussitôt et centrifugée. Nous avons dosé la nisine dans le lactosérum ainsi obtenu.

Conduite du dosage

Principe du dosage

A des dilutions croissantes d'un lactosérum dont on veut déterminer la teneur en nisine, on ajoute une culture en phase logarithmique de l'organisme-test. Après un temps d'incubation déterminé, on constate que le pH des tubes a varié proportionnellement à la concentration en nisine, et ceci avec une bonne approximation, à condition de rester dans certaines limites de concentrations. C'est le principe de la méthode de dosage A_2 en lait tournesolé de BERRIDGE (8).

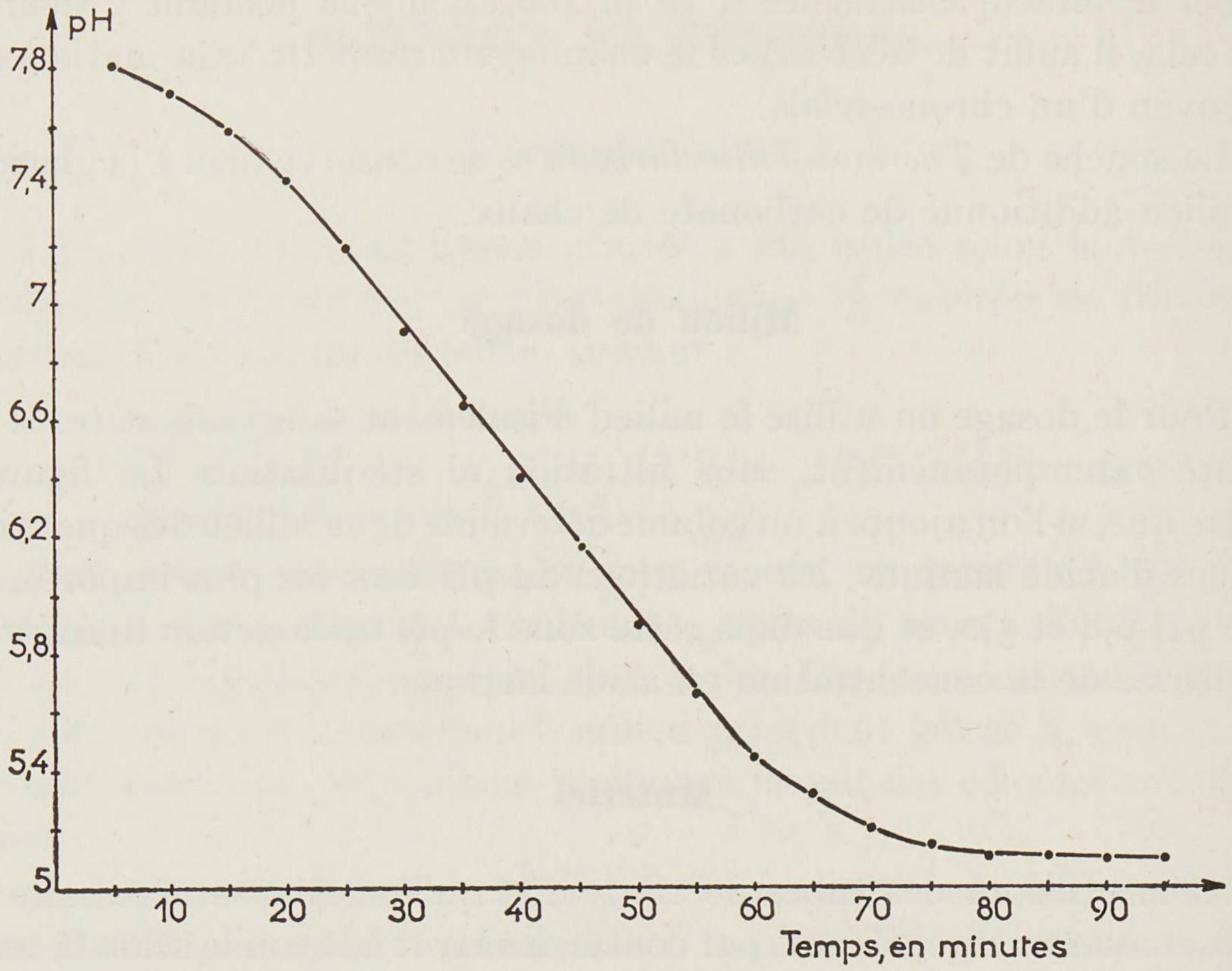


FIG. 1. — Évolution du pH en fonction du temps dans le milieu de Guittonneau ensemencé avec *Thermobacillus tarbellicus*. La phase de latence n'est pas figurée.

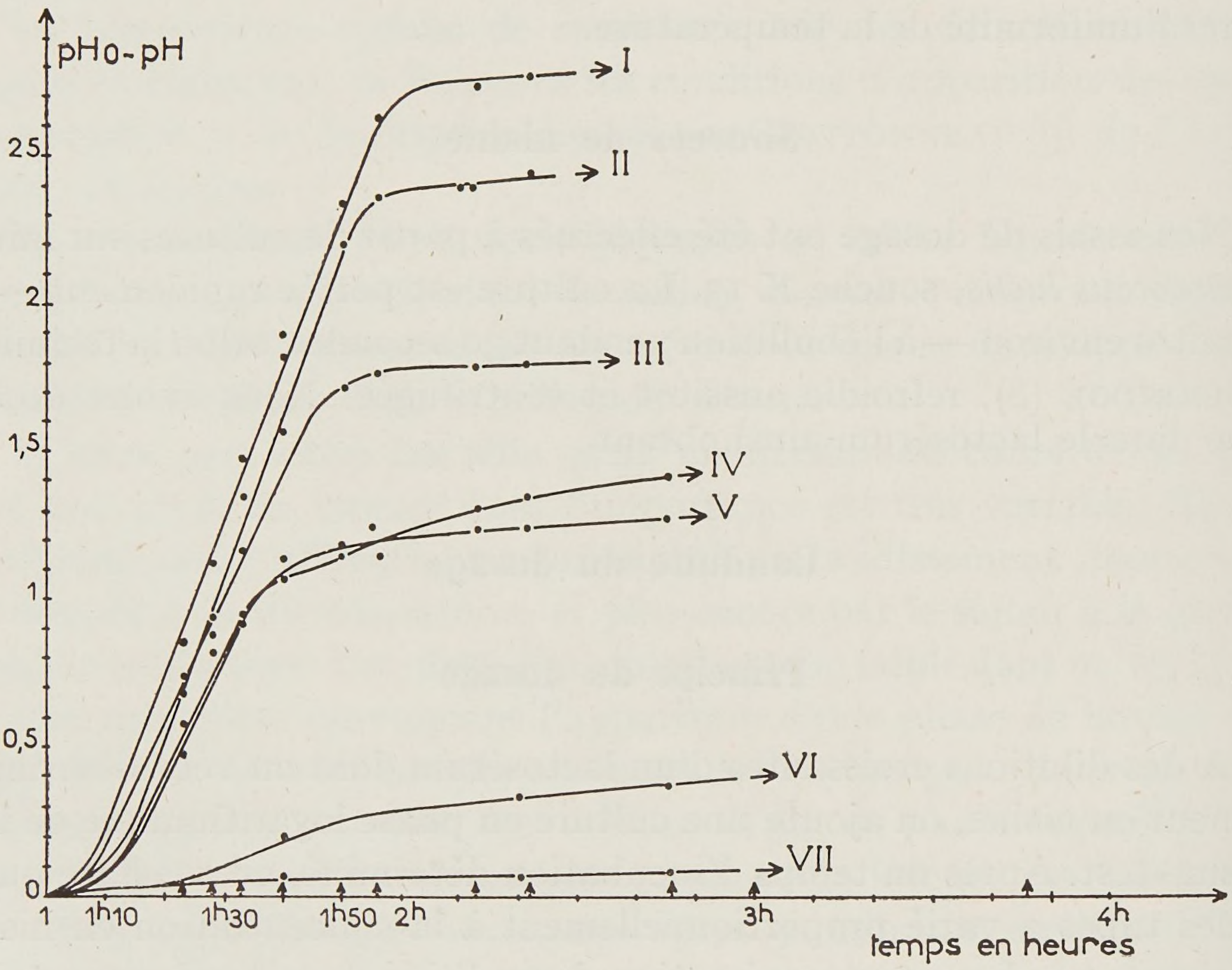


FIG. 2. — Influence du pH initial (pH_0) sur l'évolution du pH en fonction du temps dans le milieu de Guittonneau ensemencé avec *Thermobacillus tarbellicus*. Courbe I : $pH_0 = 8{,}10$. — Courbe II : $pH_0 = 7{,}76$. — Courbe III : $pH_0 = 7{,}24$. — Courbe IV : $pH_0 = 6{,}94$. — Courbe V : $pH_0 = 6{,}78$. — Courbe VI : $pH_0 = 6{,}58$. — Courbe VII : $pH_0 = 5{,}70$.

Obtention d'une culture en phase logarithmique

Une culture parvenue en fin de croissance logarithmique est repiquée à 10 p. 100 dans du milieu neuf. On fait subir à ce milieu ensemencé une pré-incubation de 60 minutes environ qui, si l'inoculum n'a pas été refroidi, abaisse le pH de 8,0 à 6,5 : on se place ainsi en pleine phase logarithmique de croissance (fig. 1), et à la limite de la zone où les variations de pH sont les plus importantes dans le milieu de dosage (fig. 3).

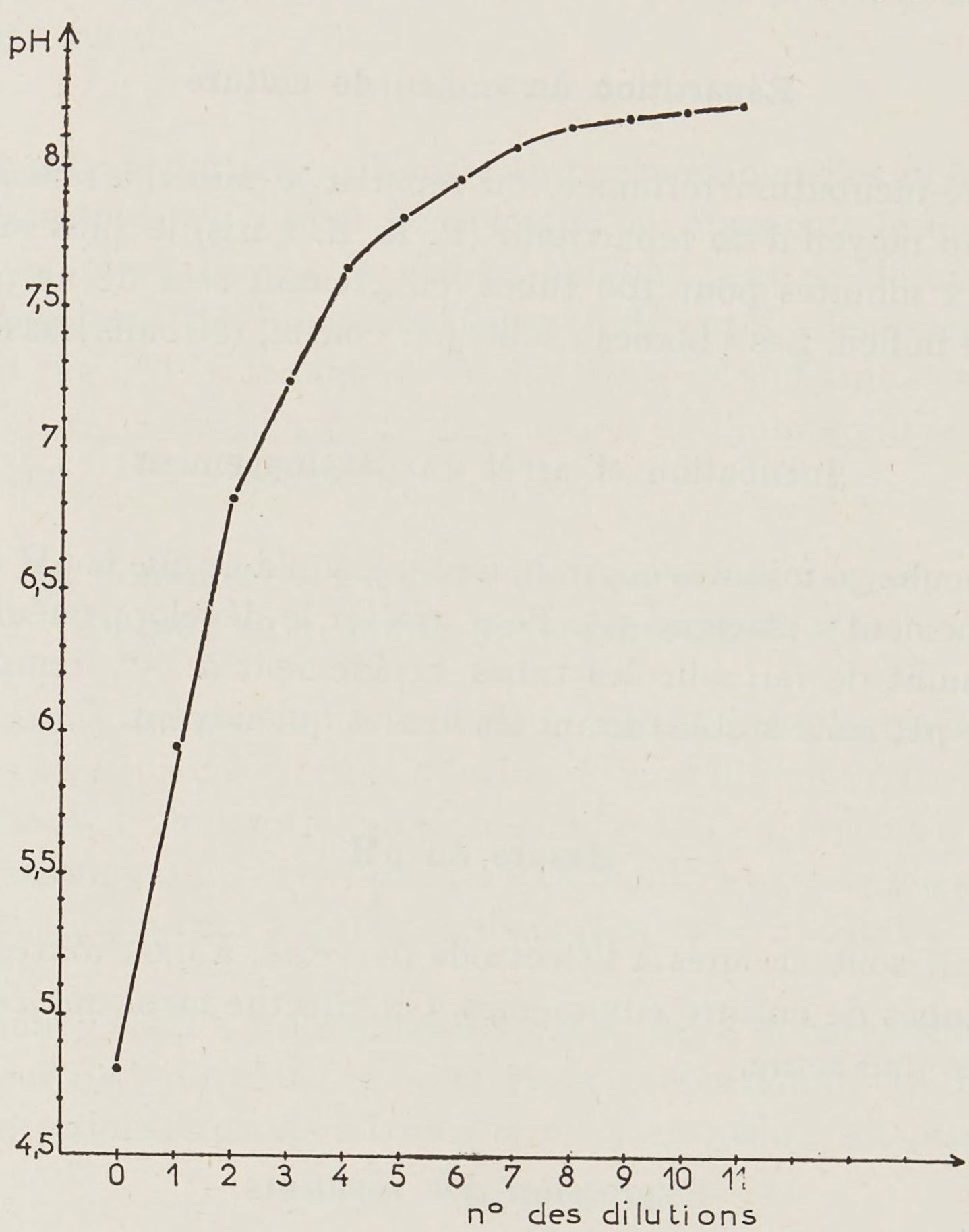


FIG. 3. — Variations du pH en fonction des quantités d'acide lactique ajoutées au milieu de Guittonneau non ensemencé. La dilution notée 0 correspond à 105 µg d'acide lactique par ml du milieu de culture. Les dilutions suivantes sont entre elles dans le rapport 2/3.

Dilution du lactosérum contenant la nisine

Avant la fin de la pré-incubation, on prépare les dilutions du lactosérum contenant la nisine. Une première dilution est faite à la pipette, au 1/10 ou au 1/20 selon la concentration supposée en nisine, les dilutions suivantes à la seringue selon la technique décrite par BERRIDGE (4,7). Tous les tubes reçoivent 1,5 ml de lactosérum dilué. La dilution n° 0

correspond à la dilution au 1/30 ou 1/60 du lactosérum, suivant la dilution de base, la dilution n° 1 est dans le rapport 2/3 avec celle-ci ; de même pour les autres dilutions. Le diluant est de l'eau stérile.

Chaque série de dilutions est faite en double ou en triple et encadrée de deux témoins : le « blanc » indiquant le pH du milieu au moment où l'incubation proprement dite commence, c'est-à-dire à la fin de la période de pré-incubation, le témoin « développement » indiquant le pH de la culture sans antibiotique, à la fin de l'incubation.

Répartition du milieu de culture

La pré-incubation terminée, on répartit le milieu à raison de 4 ml par tube au moyen d'un répartiteur (P. K. B. Paris) le plus rapidement possible : 2 minutes pour 100 tubes, en prenant soin de ne pas laisser refroidir le milieu. Les « blancs » sont, par contre, refroidis aussitôt à 15°.

Incubation et arrêt du développement

On incube 30 minutes environ, à 68°, jusqu'à ce que le pH du témoin « développement » atteigne 5,5. Pour arrêter le développement des bactéries, il suffit de refroidir les tubes rapidement à 15°, température à laquelle le pH reste stable durant les heures qui suivent.

Mesure du pH

Les pH sont mesurés à l'électrode de verre, à 0,02 unités pH près, dans les tubes de culture eux-mêmes. On effectue ainsi une centaine de mesures en une heure.

Expression des résultats

Nos essais étant essentiellement comparatifs, nous n'avons pas rapporté les doses de nisine à l'unité standard définie par Mattick et Hirsch (1) et par Berridge (8). Nos résultats sont illustrés par des graphiques portant les pH en ordonnée et les numéros des dilutions en abscisse : on compare la teneur en nisine des divers lactosérums en comparant les dilutions de ces lactosérums qui correspondent à une même valeur du pH.

RÉSULTATS

I. Allure des courbes de dosage

La figure 4 montre l'allure des courbes que l'on peut obtenir à partir de divers lactosérums contenant de la nisine, suivant le nombre de dilutions. Avec peu de dilutions, 5 ou 6, la courbe est une droite avec une bonne approximation, et la relation entre le pH et la concentration c en nisine peut s'écrire :

$$pH = k \log. c$$

puisque les valeurs portées en abscisse sont proportionnelles au logarithme des concentrations en nisine. Mais lorsqu'on augmente le nombre des dilutions, on constate que la courbe obtenue peut se décomposer en plusieurs segments de droite, de pentes différentes : deux segments et même trois (fig. 4 B) si le nombre de dilutions est suffisant et si le temps d'incubation est assez long pour que l'action de l'inhibiteur se manifeste aux dilutions les plus poussées.

II. Comparaison, à partir des courbes de dosage, du taux en nisine de lactosérums différents

Comparons les courbes A et B de la figure 4. Le lactosérum est le même dans les deux cas, mais la dilution de base diffère : 1/10 dans le cas de la courbe A, 1/20 dans le cas de la courbe B. Ceci revient à comparer deux lactosérums différents dont l'un contient deux fois plus de nisine que l'autre. Comment, à partir des courbes expérimentales, retrouver ce résultat ?

Évaluons l'écart Δx des abscisses x_1 et x_2 (fig. 4 B) correspondant à la même valeur 6,52 du pH. Cet écart étant proportionnel au logarithme des concentrations correspondantes c_1 et c_2 en nisine, on peut écrire :

$$\log c_1 = \log c_2 + \Delta x$$

d'où :

$$\frac{c_1}{c_2} = 10^{\Delta x}$$

Le rapport des concentrations se calcule donc aisément à partir des données graphiques, compte tenu de l'échelle adoptée et du rapport des dilutions. Sur nos graphiques, 1 cm représente log. 3/2 soit 0,176.

$$\Delta x = 1{,}9 \text{ cm}$$
$$\Delta x = \log. 2{,}16$$
$$\frac{c_1}{c_2} = 2{,}16$$

On en déduit que les dilutions de base des lactosérums sont dans le rapport 2,16. Pour les valeurs 6,35 et 6,19 du pH

$$\Delta x = 2{,}1 \text{ cm}$$

$$\frac{c_1}{c_2} = 2{,}34.$$

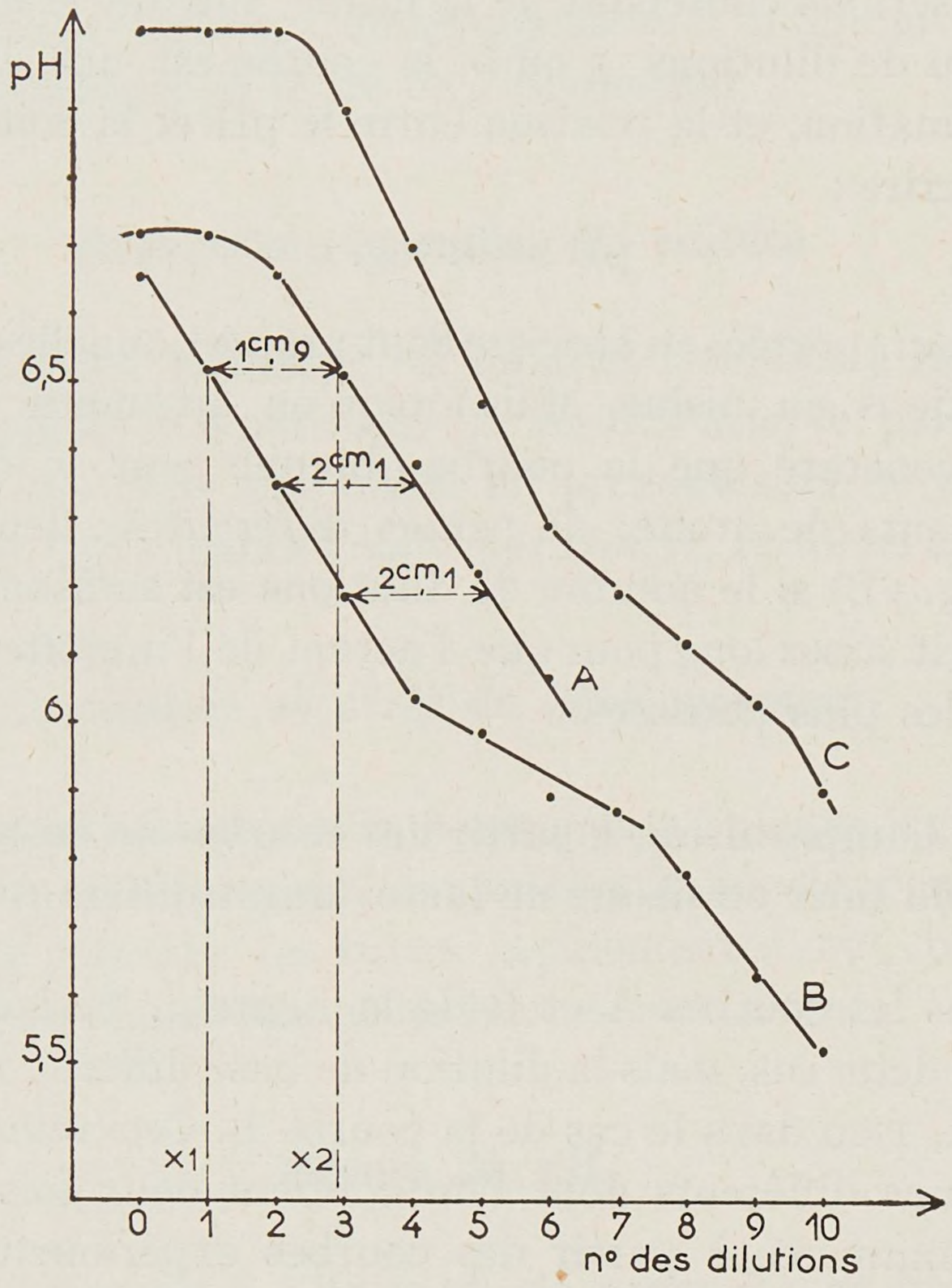


FIG. 4. — Valeurs du pH dans les différents tubes contenant les dilutions du lactosérum dont on veut doser la nisine, après un temps d'incubation déterminé. Les dilutions successives numérotées de 0 à 10, sont entre elles dans le rapport 2/3.
Les indications portées sur le graphique se rapportent aux pages 447 et 448 du texte.

La valeur moyenne de ces trois rapports : 2,16 — 2,34 — 2,34, soit 2,28, donne une idée de l'approximation des résultats : en effet le rapport théorique des concentrations en nisine des deux lactosérums A et B est 2, le rapport trouvé expérimentalement 2,28, d'où :

$$\text{Erreur p. 100} = \frac{2{,}28 - 2}{2} \cdot 100. = 14 \text{ p. 100}$$

HIRSCH (2), utilisant une méthode turbidimétrique, obtient une approximation de 10 à 15 p. 100, alors que la méthode turbidimétrique de BERRIDGE (7) permet une approximation de 5,9 p. 100 à 9 p. 100.

III. Influence des conditions expérimentales sur les résultats

Pour justifier le mode opératoire que nous avons proposé, il est important de déterminer l'influence des divers facteurs expérimentaux sur la dispersion des résultats obtenus, l'allure des courbes de dosage, et la stabilité de la nisine elle-même.

1. Effet de la répartition en phase de latence du milieu ensemencé sur le taux de croissance dans les divers tubes

Le tableau I montre les écarts notables que présentent entre eux, pour une même dilution, les pH de différentes séries de tubes lorsque le milieu ensemencé est réparti en phase de latence et non en phase logarithmique. Un tel résultat peut être rapproché, semble-t-il, de l'auto-adaptation des populations bactériennes signalée par WRIGHT (10) : dans notre essai, on peut admettre que chaque tube constitue une population bactérienne qui a son taux de croissance propre responsable des écarts de pH avec les tubes voisins.

Ce fait souligne la nécessité, pour avoir des résultats homogènes, d'éviter l'apparition d'une phase de latence dans le milieu pré-incubé, au moment de la répartition.

TABLEAU I

Influence de la répartition en phase de latence du milieu ensemencé sur la dispersion des valeurs expérimentales du pH

Temps d'incubation en minutes	pH : moyenne de 10 tubes.	Δ pH : écart maximum par rapport à la moyenne
0	8,05	0,01
30	7,84	0,02
40	7,75	0,05
45	7,70	0,02
50	7,66	0,02
55	7,60	0,05
65	7,50	0,03
80	7,31	0,13
90	7,19	0,02
100	6,99	0,21
110	6,68	0,11
115	6,62	0,31
120	6,41	0,10
130	6,18	0,16
140	6,02	0,27
150	5,84	0,11
160	5,70	0,05
170	5,60	0,07

2. Influence de la durée de pré-incubation

La figure 5 montre que si l'on fait varier le pH du « blanc » par une pré-incubation dont la durée est plus ou moins longue, les courbes obtenues à partir d'un même lactosérum sont nettement distinctes. Lorsqu'on compare des lactosérums différents, il faut donc avoir soin de choisir la même durée de pré-incubation pour les différentes séries de dosage et la répartition du milieu pré-incubé doit être assez rapide pour que le pH des « blancs » ne varie pas dans une trop large mesure.

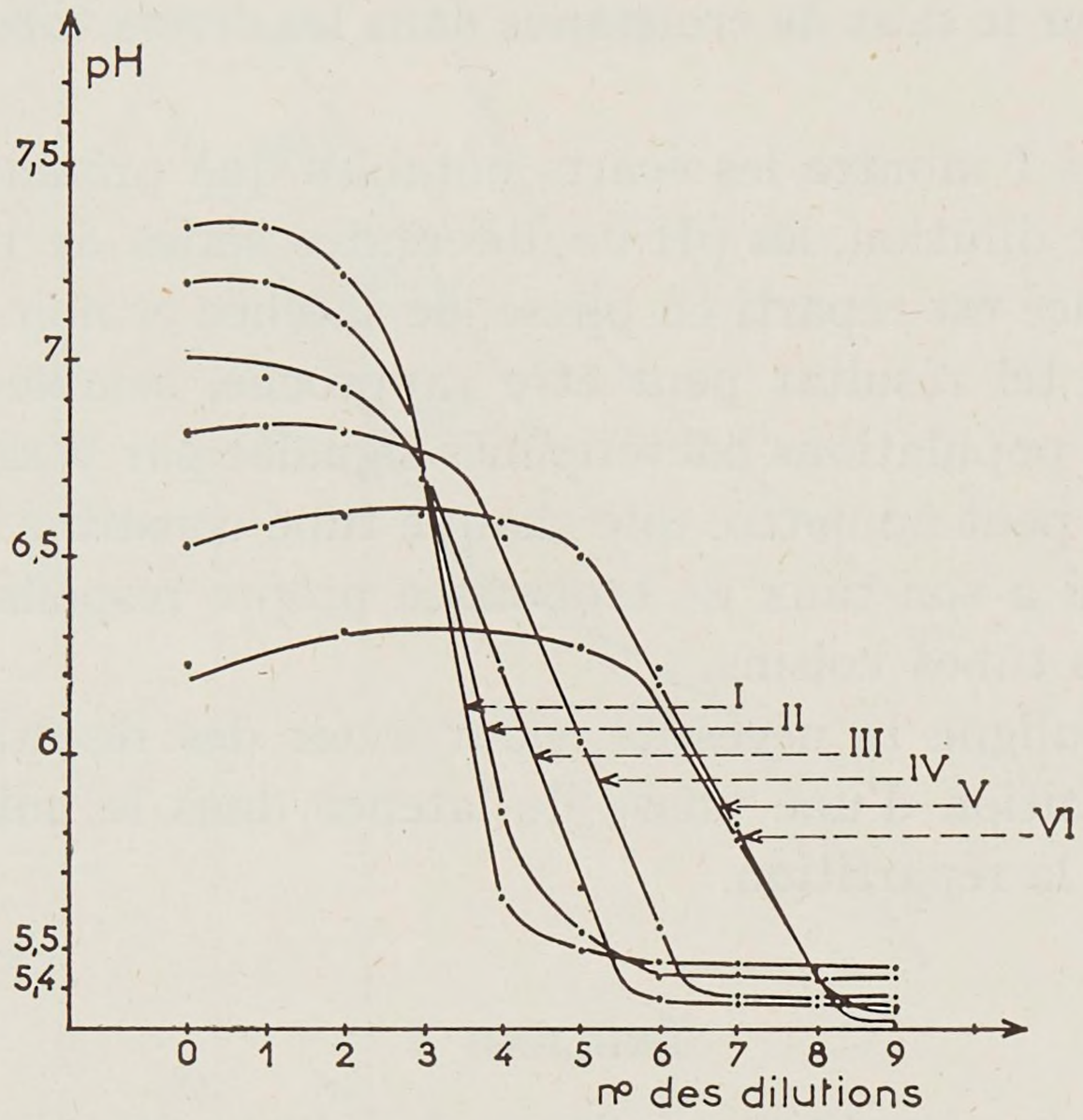


FIG. 5. — Influence du pH du « blanc » sur les valeurs correspondantes du pH dans les différents tubes contenant les dilutions du lactosérum dont on veut doser la nisine. Courbe I : pH du « blanc » = 7,34. — Courbe II : pH du « blanc » = 7,20. — Courbe III : pH du « blanc » = 7,04. — Courbe IV : pH du « blanc » = 6,83. — Courbe V : pH du « blanc » = 6,52. — Courbe VI : pH du « blanc » = 6,23.

Cette condition restreint le nombre de dosages que l'on peut effectuer en même temps. Pour répartir le milieu pré-incubé dans 100 tubes il faut environ 2 minutes, pendant lesquelles le pH du « blanc » varie de 0,1 ± 0,02 (fig. 1). La figure 5 montre que cette variation est négligeable si l'on choisit la valeur 6,5 pour le pH du « blanc » puisque, pour des pH du « blanc » compris entre 6,5 et 6,2, les courbes de dosage sont très voisines les unes des autres. Or 100 tubes correspondent en moyenne à 10 dosages. Il est donc possible d'effectuer en même temps 10 dosages.

3. Influence de la durée d'incubation

La figure 6 montre l'effet de la durée d'incubation sur la pente des segments correspondants des courbes de dosage. Si l'on veut les utiliser

Tableau II

Influence de la durée d'incubation sur la dispersion des chiffres expérimentaux

(1) 4 ml de milieu pré-incubé ;
(2) 8 ml de milieu pré-incubé ;
(3) valeur du pH dans les tubes ne contenant pas de nisine à la fin de l'incubation ;
(4) valeur du pH du milieu à la fin de la pré-incubation.

N° des dilutions	pH : moyenne de 3 tubes		Δ pH : écart maximum par rapport à la moyenne	
	30 minutes (1) d'incubation	60 minutes (2) d'incubation	30 minutes	60 minutes
0	6,60	7,62	0,02	0,03
1	6,57	7,64	0,01	0,02
2	6,50	7,58	0,02	0,02
3	6,41	7,26	0,01	0,04
4	6,32	6,23	0,02	0,17
5	6,26	5,50	0,00	0,03
6	6,21	5,50	0,01	0,01
Témoin « développement » (3)	5,97	5,18	0,01	0,01
« Blanc » (4)	6,60	7,60	0,01	0,01

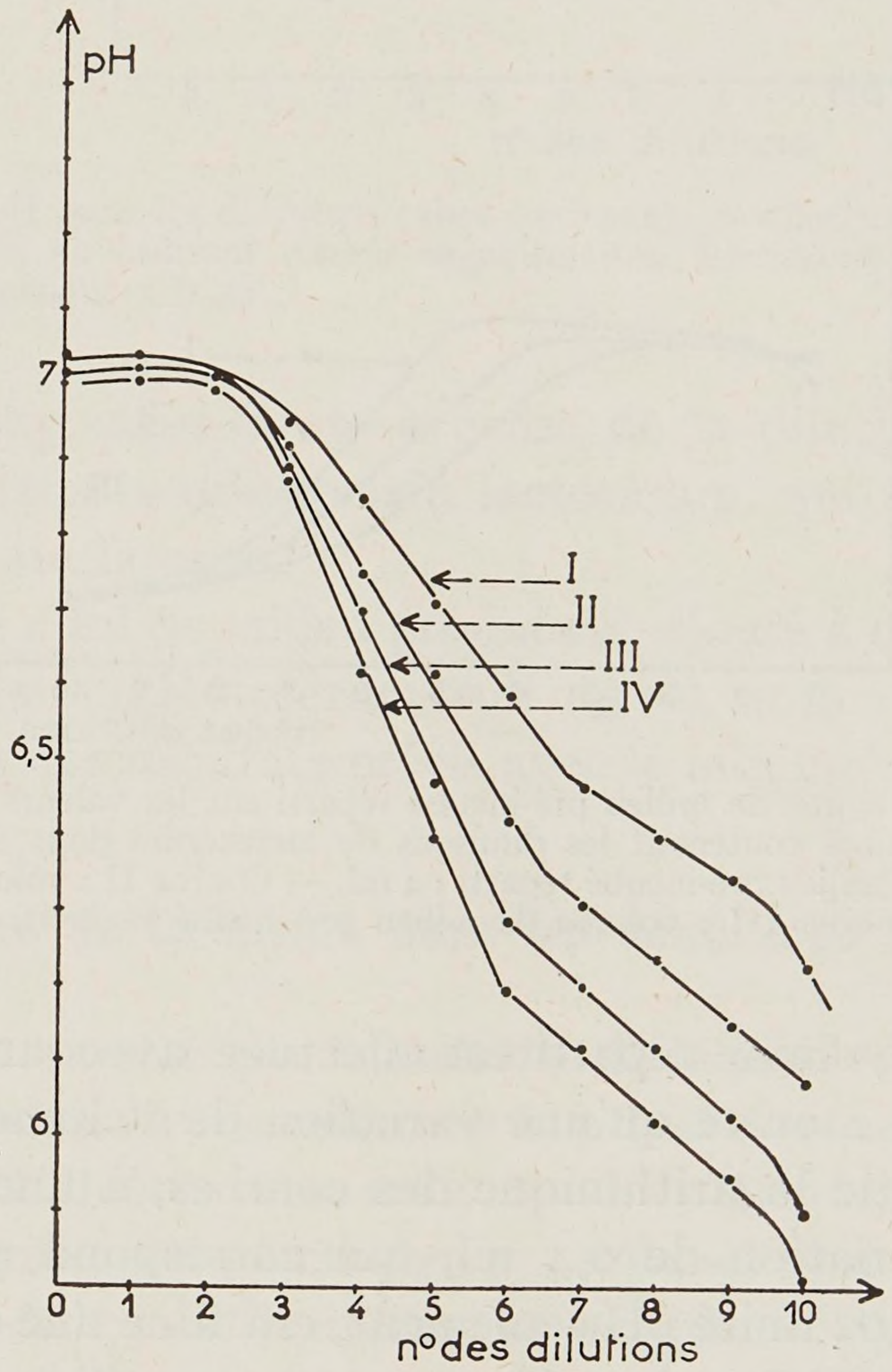


FIG. 6. — Influence du temps d'incubation sur les valeurs correspondantes du pH dans les différents tubes contenant les dilutions du lactosérum dont on veut doser la nisine. Courbe I : 30 minutes d'incubation. — Courbe II : 40 minutes d'incubation. — Courbe III : 50 minutes d'incubation. — Courbe IV : 60 minutes d'incubation.

pour comparer les teneurs en nisine de divers lactosérums, il faut conserver un temps d'incubation constant, à 2 minutes près.

A-t-on intérêt à prolonger le temps d'incubation ? Le tableau II montre que, lorsque l'écart entre deux pH successifs d'une même série de dilutions augmente, par suite d'une incubation prolongée, la dispersion des chiffres expérimentaux augmente aussi. Ce fait est peut-être à relier au phénomène d'auto-adaptation : dans les tubes qui contiennent la nisine, une phase de latence s'établit, du fait que les cellules intactes y sont moins nombreuses et se trouvent dans les conditions d'un milieu ensemencé réparti en phase de latence.

Par conséquent, on n'a pas intérêt à prolonger le temps d'incubation puisque la précision des résultats n'est pas améliorée et que, par ailleurs, on cherche à obtenir une réponse rapide.

4. Influence du volume de milieu pré-incubé réparti dans chaque tube

La figure 7 montre que, lorsqu'on répartit des volumes variables de milieu pré-incubé dans chaque tube, les courbes de dosage sont nettement distinctes. Pour qu'elles soient comparables il faut donc s'assurer

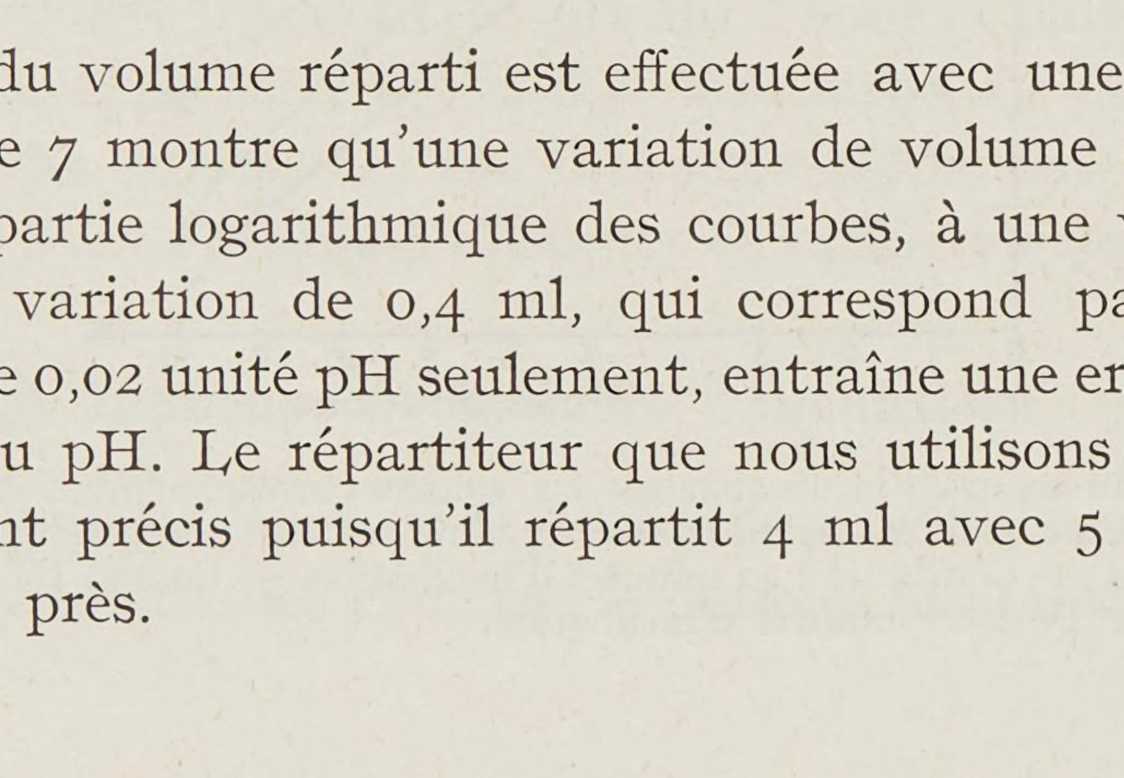


FIG. 7. — Influence du volume de milieu pré-incubé réparti sur les valeurs correspondantes du pH dans les différents tubes contenant les dilutions de lactosérum dont on veut doser la nisine. Courbe I : volume de milieu pré-incubé réparti : 4 ml. — Courbe II : volume de milieu pré-incubé réparti : 6 ml. — Courbe III : volume de milieu pré-incubé réparti : 8 ml.

que la mesure du volume réparti est effectuée avec une précision suffisante. La figure 7 montre qu'une variation de volume de 2 ml correspond, dans la partie logarithmique des courbes, à une variation de 0,1 unité pH. Une variation de 0,4 ml, qui correspond par conséquent à une variation de 0,02 unité pH seulement, entraîne une erreur négligeable sur la valeur du pH. Le répartiteur que nous utilisons dans nos essais est suffisamment précis puisqu'il répartit 4 ml avec 5 p. 100 d'erreur soit à 0,2 ml près.

En ce qui concerne le volume de milieu pré-incubé à distribuer dans chaque tube, on a intérêt à le choisir aussi faible que possible. On réduit ainsi la dilution supplémentaire du lactosérum introduite par le milieu pré-incubé, la quantité de milieu à répartir et la durée de la répartition.

Cependant, l'expérience montre que si l'on distribue moins de 4 ml de milieu pré-incubé par tube la dispersion des chiffres expérimentaux

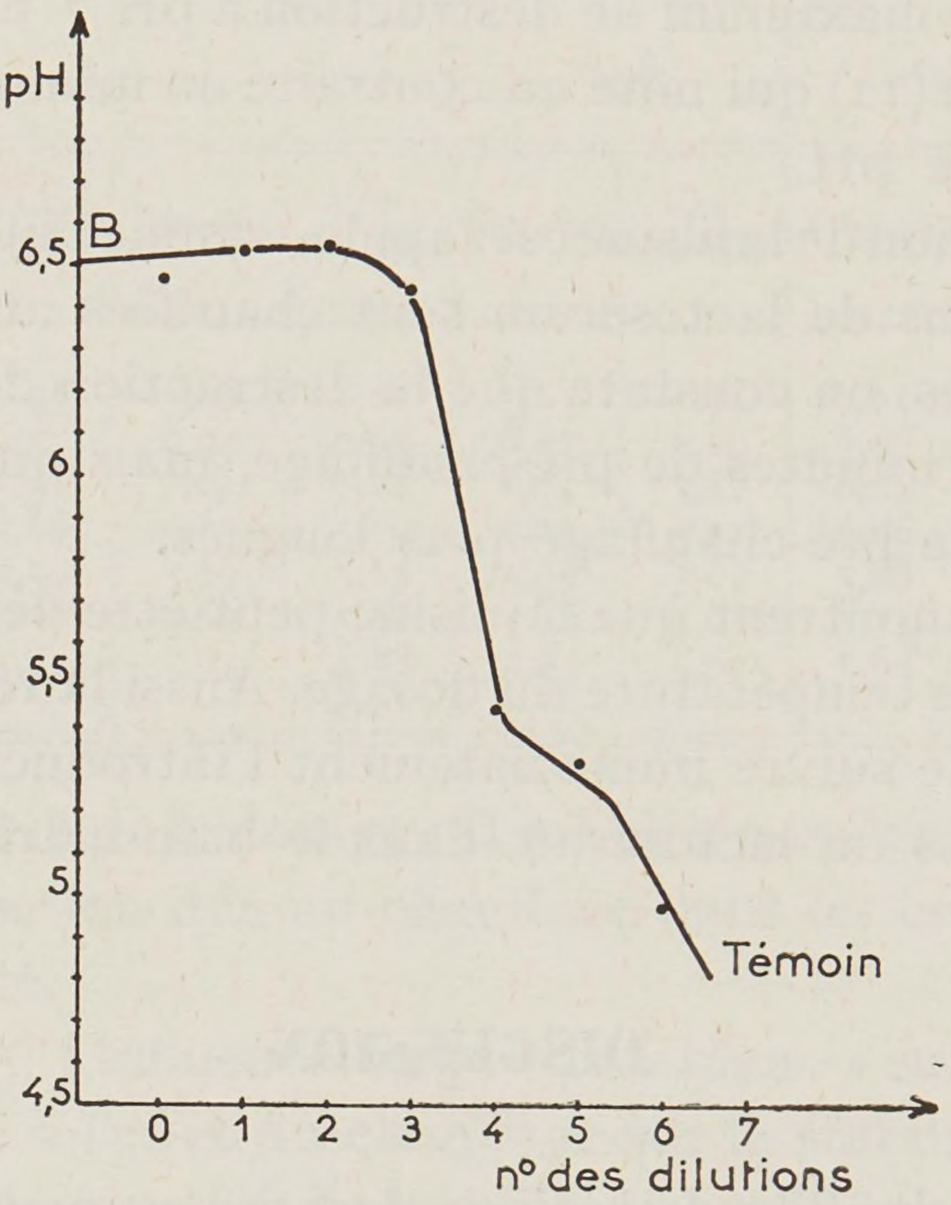


FIG. 8. — Valeurs du pH dans les différents tubes contenant les dilutions du lactosérum dont on veut doser la nisine, en utilisant comme organisme-test *Lactobacillus helveticus*, souche E_4. Incubation à 45° pendant 1 h 40.

augmente beaucoup, sans doute à cause de la dilution des cellules de l'organisme-test dans la dilution du lactosérum, qui provoque l'apparition d'une phase de latence.

Ce volume de 4 ml de milieu pré-incubé ajouté à chaque tube contenant déjà la dilution du lactosérum, soit 1,5 ml, nous a paru le plus favorable pour obtenir des résultats précis avec le minimum de milieu.

5. Stabilité de la nisine dans les conditions du dosage

HIRSCH (11) a montré que la stabilité de la nisine diminue beaucoup de pH 4 à pH 8, c'est-à-dire dans la zone de pH où nous nous sommes placés.

Le tableau III illustre cette influence du pH sur la destruction de la nisine dans les dilutions du lactosérum : celles-ci sont chauffées 1 heure à 68°, en présence de 2,5 ml de milieu non ensemencé ajusté au pH voulu. Après ce pré-chauffage, on dose la nisine non détruite en comparant avec une série de dilutions témoins.

On voit que, lorsque le pré-chauffage a lieu aux pH 7,32, 7,14, 6,80,

6,48, la proportion de nisine détruite dans les dilutions de lactosérum est d'environ 1/3 puisque le tube contenant la dilution 4, dans la série ayant subi un pré-chauffage, a le même pH que celui contenant la dilution 5 de la série témoin. A pH 6,98 le tableau III montre que la proportion de nisine détruite est plus élevée, le tube contenant la dilution 3 dans la série pré-chauffée ayant le même pH que celui contenant la dilution 5 de la série témoin. Ce maximum de destruction à pH 7 n'est cependant pas trouvé par HIRSCH (11) qui note au contraire un minimum de destruction de la nisine vers ce pH.

Cette destruction de la nisine est rapide, comme l'indique le tableau IV : lorsque les dilutions de lactosérum sont chauffées au même pH durant des temps variables, on constate que la destruction de la nisine se manifeste déjà après 5 minutes de pré-chauffage, mais qu'elle augmente peu pour des durées de pré-chauffage plus longues.

Ces résultats montrent que la nisine peut être détruite dans les conditions de pH et de température du dosage. Aussi la répartition du milieu pré-incubé doit-elle suivre immédiatement l'introduction des tubes contenant les dilutions du lactosérum dans le bain-marie à 68°.

DISCUSSION

L'utilisation de *Thermobacillus tarbellicus* comme organisme-test pour le dosage de la nisine présente des avantages incontestables. Grâce à la grande activité enzymatique de cette bactérie thermophile, la méthode décrite prend place parmi les méthodes rapides et précises, celle de BERRIDGE (7) par exemple. L'incubation à 68° permet d'alléger considérablement le dosage, du fait qu'il n'est pas nécessaire d'employer un milieu stérile ni de manipuler dans des conditions d'asepsie rigoureuse, avec un matériel stérile. De plus l'extrême simplicité du milieu, tant dans sa composition que dans sa préparation, représente un avantage important par rapport aux milieux plus complexes nécessaires à la croissance d'organismes-test plus exigeants.

Les inconvénients de la méthode se retrouvent, pour la plupart, dans les autres procédés : nécessité de faire de nombreuses dilutions, difficulté d'avoir au moment voulu une culture convenablement pré-incubée. D'autres inconvénients sont inhérents aux caractères culturaux de l'organisme-test utilisé, principalement l'apparition d'une phase de latence importante lorsque le milieu de culture est refroidi ou lorsque la dose d'inoculation est trop faible.

On peut objecter que dans les conditions de température et de pH du dosage la destruction de la nisine fausse les résultats : cette destruction est indiscutable (tableaux III et IV), mais peut-on affirmer qu'elle inter-

Tableau III

Influence du pré-chauffage à pH variable sur la destruction de la nisine dans les dilutions de lactosérum.

Volume du milieu pré-incubé : 6 ml.
Les valeurs portées en regard des numéros des dilutions représentent les pH dans les différents tubes

pH de pré-chauffage	7,32		7,14		6,98		6,80		6,48	
N° des dilutions	Témoin	Pré-chauffé	Témoin	Pré-chauffé	Témoin	Pré-chauffé	Témoin	Pré-chauffé	Témoin	Pré-chauffé
2.....	7,11	6,95	7,06	7,01	7,03	6,71	7,01	7,00	—	6,97
3.....	6,95	6,51	6,94	6,65	6,97	6,19	6,98	6,82	—	6,68
4.....	6,45	5,91	6,61	6,10	6,64	5,82	6,82	6,28	—	6,24
5.....	5,92	5,68	6,10	5,74	6,09	5,71	6,26	5,92	6,23	5,87
6.....	5,73	5,59	5,79	5,65	5,80	5,65	5,88	5,76	5,94	5,82
7.....	5,66	5,56	5,67	5,56	5,68	5,65	5,73	5,70	5,82	5,72
8.....	5,62	5,53	5,63	5,58	5,65	5,62	5,68	5,67	5,79	5,73

vient effectivement dans le dosage ? Il est bien possible que la nisine agisse avant toute destruction dûe au chauffage dans les conditions de pH où l'on se trouve placé.

On a vu (fig. 5) l'influence du pH du « blanc » sur les résultats : elle n'est pas identique à l'effet du chauffage sur la stabilité de la nisine. En effet, alors que la destruction de la nisine est la même à pH 7,32 et à pH 6,48 (tableau III), la concentration apparente de la nisine diminue constamment (fig. 5) lorsque le pH du blanc varie de 7,32 à 6,23 ; il faut donc penser que d'autres facteurs interviennent pour expliquer cet effet du pH du « blanc » sur les résultats, par exemple l'âge moyen

Tableau IV

Destruction de la nisine dans les dilutions de lactosérum en fonction du temps de pré-chauffage, en présence de 2,5 ml de milieu non ensemencé à pH 6,6.

Volume du milieu pré-incubé réparti : 6 ml.
Les valeurs portées en regard des numéros des dilutions représentent les pH dans les différents tubes

N° des dilutions	5 minutes		15 minutes		30 minutes		45 minutes		60 minutes	
	Témoin	Pré-chauffé	Témoin	Pré-chauffé	Témoin	Pré-chauffé	Témoin	Pré-chauffé	Témoin	Pré-chauffé
2.....	6,68	6,59	6,62	6,57	6,62	6,52	6,59	6,51	6,58	6,49
3.....	6,55	6,44	6,50	6,46	6,47	6,40	6,50	6,40	6,45	6,35
4.....	6,34	6,10	6,35	6,17	6,33	6,10	6,38	6,08	6,33	5,97
5.....	5,73	5,58	5,87	5,60	5,98	5,57	6,05	5,59	5,90	5,58
6.....	5,66	5,61	5,57	5,59	5,58	5,58	5,58	5,60	—	5,56
7.....	5,60	5,61	5,60	5,61	5,59	5,59	5,57	5,61	5,60	5,56

des cellules qui modifierait leur sensibilité vis-à-vis de la nisine, ou encore le mode d'action de la nisine qui serait étroitement dépendant du pH du milieu.

D'autre part nous avons vu que les courbes de dosage pouvaient se décomposer en segments de droite à pentes différentes, dans des conditions déterminées. La figure 3 montre que ces changements de pente ne sont pas dûs au pouvoir tampon du milieu. BERRIDGE (7) a signalé de telles irrégularités de pente dans les courbes de dosage, qu'il interprète par la présence de plusieurs facteurs antibiotiques. En effet, on peut penser que l'organisme-test réagit différemment à ces facteurs antibiotiques : l'un agirait aux faibles dilutions, un autre aux fortes dilutions, un troisième aux dilutions intermédiaires, ou bien deux facteurs seulement interviendraient, présentant une interaction aux dilutions intermédiaires. BERRIDGE (12) a d'ailleurs séparé 5 nisines différentes : A, B, C, D et E, produites par *Streptococcus lactis*. Il est intéressant de rapprocher ces résultats de ceux signalés par AUCLAIR et HIRSCH (13) avec les lacténines. Nous avons nous-même obtenu des résultats analogues avec un autre organisme-test, *Lactobacillus helveticus* : en suivant l'évolution du pH en fonction des dilutions du lactosérum contenant la nisine, on constate des changements de pente reproductibles dans la courbe de dosage (fig. 8).

Quoiqu'il en soit, l'absence d'une réponse parfaitement linéaire pour l'ensemble des dilutions du lactosérum contenant la nisine complique le problème de l'expression des résultats en unités standard, et soulève également le problème des autres antibiotiques produits par les différentes souches de *Streptococcus lactis*.

Résumé

Une bactérie thermophile, *Thermobacillus tarbellicus*, saccharolytique, dont l'optimum de croissance est 68°, a été utilisée pour un dosage rapide de la nisine produite par *Streptococcus lactis*. Elle est cultivée sur un milieu simple, à base de peptone et de saccharose, qu'il n'est pas nécessaire d'autoclaver, avec un matériel non stérile et sans précautions spéciales d'asepsie dans les manipulations. On suit les variations du pH du milieu de culture en fonction des concentrations en nisine du lactosérum.

Les courbes obtenues présentent, dans des conditions qui sont précisées, des changements de pente reproductibles suggérant la présence de plusieurs facteurs antibiotiques dans les lactosérums étudiés.

L'influence de certaines conditions expérimentales sur les résultats du dosage est envisagée : influence de la répartition en phase de latence

du milieu ensemencé, de la durée de pré-incubation, de la durée d'incubation, du volume de milieu pré-incubé réparti dans chaque tube. Enfin la stabilité de la nisine dans les conditions du dosage est étudiée.

Nous exprimons notre profonde reconnaissance à M. Mocquot et à M. Chevalier pour l'aide et les conseils qu'ils nous ont donnés au cours de ce travail.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Mattick (A. T. R.) and Hirsch (A.). — Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci. *Lancet*, July ii, **5**, 1947.
(2) Hirsch (A.). — The assay of the antibiotic nisin. *J. gen. Microbiol.*, **4**, 70, 1950.
(3) Friedmann (R.). and Beach (S. A.). — New methods of assay for the antibiotic nisin. *J. gen. Microbiol.*, **5**, v, 1951.
(4) Berridge (N. J.) and Barrett (J.). — A rapid turbidimetric method for the assay of antibiotics. *Nature*, **167**, 448, 1951.
(5) Friedmann (R.) and Epstein (C.). — The assay of the antibiotic nisin by means of a reductase (resazurin) test. *J. gen. Microbiol.*, **5**, 830, 1951.
(6) Beach (S. A.). — An agar diffusion method for the antibiotic nisin. *J. gen. Microbiol.*, **6**, 60, 1952.
(7) Berridge (N. J.) and Barrett (J.). — A rapid method for the turbidimetric assay of antibiotics. *J. gen. Microbiol.*, **6**, 14, 1952.
(8) Berridge (N. J.). — Preparation of the antibiotic nisin. *Biochem. J.*, **45**, 486, 1949.
(9) Guittonneau (G.). — Sur un bacille sporulé thermophile fonctionnant comme ferment lactique. *C. R. Ac. Sc.*, **187**, 69, 1928.
(10) Wright (B. E.). — Auto-adaptation : a new phenomenon observed in a bacterial population. *J. Bact.*, **66**, 407, 1953.
(11) Hirsch (A.). — Growth and nisin production of a strain of *Streptococcus lactis*. *J. gen. Microbiol.*, **5**, 208, 1951.
(12) Berridge (N. J.), Newton (G. G. F.) and Abraham (E. P.). — Purification and nature of the antibiotic nisin. *Biochem. J.*, **52**, 529, 1952.
(13) Auclair (J. E.) and Hirsch (A.). — The inhibition of microorganisms by raw milk. I. The occurrence of inhibitory and stimulatory phenomena. Methods of estimation. *J. Dairy Res.*, **20**, 45, 1953.

OBSERVATIONS SUR LA DÉGUSTATION DES DENRÉES ALIMENTAIRES

PAR

P. GALZY et **R. MARIE**

Centre de Recherches Agronomiques du Midi
École Nationale d'Agriculture, Montpellier

PLAN DU MÉMOIRE

Introduction.

I. — **Rappel des données psychophysiologiques de toute dégustation.**
- 1° Les systèmes sensoriels.
- 2° Les techniques.

II. — **Principales applications d'une dégustation rationnelle.**
- 1° Sondage d'opinion parmi les consommateurs.
- 2° Contrôle industriel de la qualité.
- 3° Études de laboratoire.
  - *a*) Comparaisons.
  - *b*) Notations.
  - *c*) Classements.

Conclusion.

Bibliographie.

INTRODUCTION

On peut distinguer deux sortes de dégustations : l'une s'applique à un matériel déjà sélectionné (boissons, fruits, produits laitiers, etc.) dont on veut faire connaître les qualités relatives. Il s'agit ici d'une démonstration dont la réussite relève du domaine de l'art.

L'autre que l'on peut qualifier de rationnelle, vise à découvrir lesquels, parmi une série d'échantillons, présentent des différences nettes pour un caractère donné, et à déterminer au mieux la valeur de ces différences. On a là un véritable essai comparatif, dont on prévoit facilement qu'il ne saurait avoir la rigueur d'un essai effectué au moyen d'un appareil physique de mesure. Le classement auquel il donne lieu n'a de sanction, en effet, que selon le « degré d'unanimité » d'un jury donné, et l'on sait combien les réactions sensorielles varient avec les individus.

Nous aurons à considérer que les échantillons ont à subir les épreuves d'un examen, dont les résultats émanent de la mise en présence de deux facteurs : les dégustateurs et les produits à déguster.

I. — RAPPEL DES DONNÉES PSYCHOPHYSIOLOGIQUES DE TOUTE DÉGUSTATION

1° Les systèmes sensoriels

L'examen organoleptique d'un produit alimentaire fait généralement appel aux sens de la vue, du goût et de l'odorat. Le toucher entre également en ligne de compte, bien qu'à un degré moindre : la texture des substances dégustables peut en effet varier considérablement, de l'état liquide à l'état solide plus ou moins consistant, en passant par un grand nombre d'intermédiaires : suspensions, émulsions, gels...

Il paraît utile, pour envisager dans chaque cas particulier les meilleures conditions expérimentales, de rappeler le rôle, le fonctionnement et les limites des principaux organes des sens mis en jeu au cours d'une dégustation.

a) La vue

Elle permet de juger la présentation d'un produit, présentation dont il est inutile de souligner l'importance commerciale. L'œil peut apprécier les formes, les couleurs, et même certaines structures (limpidité par exemple).

Pour la couleur, on peut la déterminer au moyen des divers codes et échelles internationales, par comparaison avec des étalons classés. Le sens de la vue, qui est très bien développé chez l'homme, permet d'apprécier des différences assez fines. Les erreurs sont en général grossières lorsqu'elles se produisent et sont le fait de troubles sérieux de la vision (daltonisme...).

En ce qui concerne l'intensité, il est possible de pousser davantage la précision qu'on obtiendrait avec une échelle de couleurs en dotant l'œil d'un colorimètre lorsque le corps analysé est transparent (liquide, gelée).

L'ensemble des formes et des couleurs impressionne plus ou moins favorablement le dégustateur et peut influencer les jugements qu'il pourra émettre par la suite sur la qualité.

b) L'odorat

Il s'agit d'un sens très subtil, qui intervient en deuxième lieu dans l'étude du produit. L'odeur qu'on attribue à celui-ci est quelque chose de plus compliqué que son aspect visuel. Elle est la résultante de l'action d'un nombre assez grand de substances volatiles (16). Le parfum dégagé dépend des substances présentes, de leur activité olfactive propre, mais aussi de tous les facteurs susceptibles de modifier leur volatilité (température, hygrométrie, etc.).

Les seules déterminations commodes en matière d'olfaction sont dès lors qualitatives ; il reste possible de classer une série de produits d'après l'agrément ou le désagrément des sensations olfactives qu'ils procurent, et de caractériser chacun d'eux grâce au riche vocabulaire de la gastronomie (10). On est ainsi réduit à des appréciations subjectives mal coordonnées puisqu'on ne dispose pas d'échelle reproductible des parfums.

On peut remarquer par contre que l'odeur d'un produit est perceptible non seulement par les fosses nasales mais aussi par l'arrière du palais qui les continue, ce qui donne l'impression qu'elle participe à l'ensemble des facteurs qui constituent le goût.

c) Le goût

La saveur d'un aliment est classiquement décomposée en quatre saveurs de base (sucré, salé, amer, acide) qui seraient détectées sélectivement par différentes parties de l'organe du goût (15).

L'existence de substances possédant une seule de ces quatre saveurs permet de créer des échelles de références facilement reproductibles. On utilise plusieurs doses de saccharose par exemple pour représenter le sucré, de chlorure de sodium pour le salé, de sulfate de quinine pour l'amer, et d'acide tartrique pour l'acide.

Beebe-Center et Waddel ont défini de la sorte une échelle en « gusts » relative aux quatre saveurs et dont nous verrons une application éventuelle (3-4).

2° Les techniques

La conduite de l'expérimentation en matière organoleptique a déjà fait l'objet d'exposés spécialisés dont les références figurent en bibliographie (11-12-17).

Nous passerons rapidement en revue les différentes précautions recommandées par la majorité des auteurs, et indispensables à la réussite de la dégustation.

En principe général, tout doit concourir à procurer des données *interprétables*. Il faut en premier lieu que l'échantillonnage du produit soit correct : dans certains cas, il faudra homogénéiser la masse avant prélèvement, dans d'autres, il sera nécessaire de décanter au préalable (vin vieux par exemple) ; le dernier échantillon doit obligatoirement être identique au premier.

Ensuite, il y a lieu d'observer un certain nombre de règles qui tendent à présenter les échantillons de sorte que le jugement du dégustateur soit aisé et le plus sûr possible.

a) Mettre les échantillons sous numéro tiré au hasard. Le dégustateur doit ignorer le dispositif expérimental (répétitions) sauf cas particulier (test triangulaire).

b) Afin d'éliminer au maximum toute cause d'erreur, tous les dégustateurs doivent être placés dans les mêmes conditions et respecter une certaine discipline, en particulier l'ordre de dégustation qui leur est prescrit.

c) Le dégustateur sera isolé de toute influence extérieure de nature à modifier son jugement.

d) Neutraliser les goûts rémanents en observant un temps de latence entre chaque test.

e) Limiter le nombre des échantillons pour prévenir les risques de fatigue en entraînant un affaiblissement de l'acuité sensorielle. Cette limitation sera encore plus sévère si l'on a prévu des répétitions.

f) N'apprécier si possible qu'un seul caractère à la fois. On refera une dégustation pour chacun des autres caractères si le produit se prête à une analyse multiple.

g) Contrôler le déroulement correct de l'expérience.

Dans le cas où la dégustation est utilisée à des fins de contrôle ou de recherche, il est souhaitable de disposer d'un nombre de dégustateurs aussi élevé que possible ; il est entendu que ces derniers seront soigneusement recrutés, éduqués et entraînés. Plusieurs auteurs ont montré en outre qu'il était possible

de réduire l'importance d'un tel jury d'autant plus que celui-ci aura été mieux préparé. Dans d'autres cas (referendum par exemple), une pareille précaution n'est pas indiquée.

Cela nous amène à distinguer plusieurs types d'application d'un examen organoleptique dirigé.

II. — PRINCIPALES APPLICATIONS D'UNE DÉGUSTATION RATIONNELLE

Nous rappellerons qu'il ne s'agit pas ici de techniques publicitaires, mais de méthodes de recherche technologique sur le thème de la qualité.

1° Sondage d'opinion

On désire par exemple se rendre compte dans quelle mesure une catégorie de consommateurs reconnaît et apprécie une modification de qualité tenue pour une amélioration du produit. On fera une sorte de dégustation referendum qui comportera au moins la première des deux questions suivantes :

L'échantillon B est-il meilleur que l'échantillon A ?

Si oui, cette différence justifie-t-elle l'augmentation du prix de x francs ?

On suppose que sur N dégustateurs, n ont apprécié la supériorité de B. Parmi eux n' seulement ont répondu oui à la deuxième question.

Si n est significativement différent de $\frac{N}{2}$, on est assuré au seuil choisi, par exemple 0,05, que les réponses à la première question n'ont pas été données au hasard. On peut appliquer ici le critérium χ^2 avec 1 degré de liberté, ce qui revient à comparer la valeur $\chi^2 = \frac{(N/2 - n)^2}{N/2}$ ou $\frac{(N - 2n)^2}{2N}$ à la valeur limite $\chi^2_0 = 3{,}841$ prise dans la Table de PEARSON.

Si $\chi^2 > \chi^2_0$, la première réponse est oui ou non selon que n est supérieur ou inférieur à N/2. Dans le cas contraire, on ne peut pas conclure : ou bien il n'y avait pas, au goût du public de différence sûre ou bien les dégustateurs n'étaient pas assez nombreux pour la mettre en évidence. Dans cette dernière éventualité (présumée) il peut être utile de recommencer la dégustation avec un nombre de dégustateurs plus élevé.

La deuxième question met en jeu plusieurs causes complexes qui faussent l'interprétation de la réponse, en particulier le pouvoir d'achat du consommateur ; cependant, la réponse a une importance indéniable pour le prolongement pratique d'une amélioration de qualité, et seule la valeur du rapport $\frac{n - n'}{n'}$ peut montrer quel est l'intérêt commercial que présente le produit amélioré, relativement au public consulté.

Celui-ci est autant que possible échantillonné selon les méthodes de sondage d'opinion actuellement éprouvées.

2° Contrôle industriel

On cherche à vérifier la constance de qualité dans une fabrication déterminée de produits comestibles.

Ce problème courant a été déjà résolu de plusieurs manières dont nous

retiendrons le « test triangulaire » mis au point par HELM et TROLLE (14) en 1946 pour la bière et appliqué au vin en 1948 par AMERINE (1).

Cette épreuve consiste à soumettre à chaque dégustateur d'un jury trois échantillons dont deux sont identiques. L'échantillon impair doit être reconnu ; il est soit le témoin, soit le produit à tester.

L'interprétation des résultats est basée sur le calcul des probabilités. On fait plusieurs répétitions et on relève le nombre de réponses justes. Il y a une chance sur trois de donner une réponse correcte au hasard. Selon le nombre de répétitions et le seuil choisi, le nombre relatif de réponses justes permet de savoir si la différence est *significative pour le dégustateur*.

Il est à remarquer que cette méthode sert à tester aussi, au cours d'un même essai, quels sont les dégustateurs homogènes dans leur jugement.

Ci-dessous figure un extrait de la Table de ROESSLER et al. (1948), qui donne le *nombre minimum de réponses justes* pour que la différence testée soit significative :

Nombre de répétitions	Seuil 0,05	Seuil 0,01
7	5	6
10	7	8
12	8	9
15	9	10
20	11	13
30	16	17

3° Études de laboratoire

a) Comparaison

On cherche à déceler systématiquement toutes les différences entre deux échantillons différemment traités.

Ici le test triangulaire ne peut s'appliquer que si la différence à préciser n'existe que pour un seul caractère ; en effet, dans le cas contraire, la discrimination peut être guidée par des différences plus faciles à saisir et portant sur d'autres caractères (couleur en particulier).

On applique donc en général un test d'identification sur une paire d'échantillons répétée un certain nombre de fois, l'ordre de dégustation de chaque paire étant tiré à pile ou face (7-8).

Après dépouillement, on détermine pour chaque dégustateur le nombre **n** de fois que l'échantillon A a été classé avant B au cours de **N** répétitions.

On suppose par exemple que A diffère de B par addition d'une faible dose d'acide. A aura été jugé plus acide que B **n** fois et moins acide (**N-n**) fois.

Si le dégustateur ne discerne pas de différence et répond au hasard, l'interprétation du nombre **n** qu'il fournit est analogue à celle du nombre de fois que sort pile quand on tire **N** fois à pile ou face. On sait que **n** n'est pas forcément la moitié de **N** (qu'on supposera pair, par commodité), mais que **n** tend vers la moitié de **N** lorsqu'on poursuit les tirages, c'est-à-dire, lorsque **N** croît. Autrement dit $\frac{\mathbf{N}}{\mathbf{n}}$ tend vers $\frac{1}{2}$, probabilité de sortie de pile.

Il s'agit là d'ailleurs d'une définition de la probabilité. Mais par pur hasard, le dégustateur incompétent, que nous supposons, peut trouver l'échantillon A

plus acide que B un nombre quelconque de fois, entre O et **N**, de même qu'il pourrait sortir 0 fois, 1 fois... **N** fois pile au cours de **N** tirages. Si l'on considère une série de dégustations, **n** sera plus fréquemment voisin de **N**/2 que de O ou de **N** ; c'est ce qu'on peut traduire sur un graphique de fréquences (loi binomiale avc $p = q = 0{,}5$).

On constate que 95 fois sur 100, **n** tombe dans un intervalle $\left(\frac{N}{2} - e, \frac{N}{2} + e\right)$ et que 99 fois sur 100, **n** tombe dans un intervalle plus large $\left(\frac{N}{2} - e', \frac{N}{2} + e'\right)$.

Le premier des deux intervalles correspond au seuil dit 0,05, le second au seuil 0,01.

Si maintenant le dégustateur différencie les échantillons il trouvera A plus souvent supérieur à B en acidité que ne le prévoit le tirage au hasard. Cela revient à dire que n sortira de l'intervalle de sécurité ci-dessus défini. Si **n** sort du premier intervalle, on dira que le résultat est significatif ; s'il sort du deuxième, qu'il est hautement significatif.

Pour éviter de calculer un critère statistique à comparer à une valeur prise dans une table de probabilités, il a été dressé un tableau fournissant, en fonction de **N**, la valeur $\frac{N}{2} + e$ ou $\frac{N}{2} + e'$ que doit dépasser **n** pour pouvoir affirmer, selon le seuil choisi, que le hasard n'est pas seul responsable de la valeur **n** observée. Il est évident que plus N est grand, plus l'intervalle est resserré (à la limite il est nul pour N infini). On a donc intérêt à effectuer le plus grand nombre possible de répétitions pour augmenter la sensibilité de la dégustation : si **n** tombe dans l'intervalle, cela ne signifie pas, en effet, que le dégustateur n'a pas assez de discernement, mais que le nombre de répétitions était trop faible pour qu'il révèle son talent (en supposant que ce dernier soit réel). S'il se trompe deux fois par exemple, le résultat de l'épreuve est significatif avec 20 répétitions, il ne l'est pas avec 10.

Extraits de la table de signification (BENGTSSON) (1) (5)

Nombre de répétitions	On sait que A diffère de B		On ne sait pas si A diffère de B	
	Nombre min. de jugements corrects nécessaires pour établir une différence		Nombre min. de jugements corrects nécessaires pour établir une différence	
N	Significative (seuil 0,05)	Hautement significative (seuil 0,01)	Significative (seuil 0,05)	Hautement significative (seuil 0,01)
10	9	9	9	10
11	9	10	10	11
12	10	11	10	12
13	10	11	11	13
14	11	12	12	14
15	12	13	12	14
16	12	13	13	15
17	13	14	13	16
18	13	15	14	17
19	14	15	15	17
20	15	16	15	18
21	15	17	16	19
22	16	17	17	19
23	16	18	17	20
24	17	18	18	21
25	18	19	18	21

Remarques :

1. — N peut être soit le nombre de fois qu'un dégustateur a comparé la paire, soit le nombre total de comparaisons faites par plusieurs dégustateurs « homogènes ». Par exemple les 12 dégustations d'une personne peuvent donner un résultat équivalent à celui des 12 dégustations de 4 personnes dégustant 3 fois chacune.

2. — Il est à noter que certains auteurs utilisent le seuil 0,001 et attribuent à la différence une valeur « très hautement significative ». Pour un nombre de dégustations variant de 10 à 20, nous pensons que le seuil 0,01 peut suffire : une personne donnant régulièrement des résultats hautement significatifs peut déjà être considérée comme un bon dégustateur.

b) **Notations**

Il s'agit de placer 1 ou plusieurs échantillons dans une échelle quantitative, lors de l'analyse organoleptique d'une saveur fondamentale. Le tableau de Beebe-Center permet de matérialiser l'échelle de référence : la note d'intensité sensorielle donnée à chaque échantillon, exprimée en « gusts », est obtenue par comparaison avec l'échelle :

Intensité subjective en gusts	Concentrations en g pour 100 cm_1 d'eau			
	Saccharose	Sulfate de quinine	Acide tartrique	Chlorure de sodium
1.....	0,62	0,00020	0,0085	0,30
1,8.....	1,00	0,00043	0,0085	0,46
3,2.....	2,76	0,00087	0,0234	0,70
5,6.....	4,68	0,00174	0,0389	1,15
10.....	8,32	0,00339	0,0661	2,00
18.....	15,50	0,00646	0,1180	3,80
32.....	28,80	0,01200	0,2090	7,41
56.....	56,20	0,02240	0,4070	15,90
100.....	115,00	0,04170	0,7940	34,70

S'il est permis de considérer que le sens et la grandeur des *erreurs* de jugement ne peuvent être que l'effet du hasard, c'est-à-dire que pour un même dégustateur en face d'un même échantillon, leur *somme* s'annule lorsqu'on répète l'épreuve, l'analyse statistique s'applique dans l'interprétation des données.

Il en est de même lorsqu'on donne une note d'agréabilité de 1 à 5, de 1 à 20, de 70 à 100..., *à condition que la distribution de fréquence des notes données*, soit par de très nombreux dégustateurs à un même produit, soit par un seul dégustateur à une grande variété de produits, soit *voisine d'une distribution normale* (il existe des critères de normalité pour éprouver toute distribution expérimentale) (18).

Dans ces conditions, l'essai de dégustation est comparable à un essai comparatif couramment utilisé par exemple en recherche agronomique pour tester sur le terrain, la valeur de plusieurs variétés ou traitements. La fertilité du terrain correspond à la compétence du jury et de même qu'il est indiqué de choisir un terrain aussi homogène que possible, c'est-à-dire dont l'hétérogénéité est régulièrement répartie, on a intérêt à constituer un jury réagissant de façon semblable ; cela suppose d'abord qu'il soit sélectionné (des tests gros-

siers suffisent pour ce faire), ensuite qu'il soit éduqué de façon à comprendre le sens et les modalités de la dégustation, et enfin qu'il soit exercé, c'est-à-dire prêt à réagir convenablement.

Toutes ces conditions sont requises pour pouvoir appliquer correctement les méthodes d'analyse statistique, dont l'intérêt est évident lorsqu'on veut analyser non plus deux mais un certain nombre d'échantillons simultanément.

Il est bon de rappeler et de bien préciser qu'il y aura autant d'expériences distinctes que de secteurs d'appréciation. Cela ne signifie pas que les caractères soumis à l'examen organoleptique sont indépendants : au contraire on ne devra pas oublier que l'intensité d'un caractère peut éclipser celle d'un autre — par exemple l'acidité qui « atténue » la sensation sucrée — et que, indépendamment de son intensité réelle, un facteur organoleptique est peu actif sur le palais, tant que ce facteur est dominé, estompé par d'autres. C'est d'ailleurs pour cette raison que l'analyse chimique, pour si précise et détaillée qu'elle soit, ne peut ici remplacer la dégustation. L'expérimentateur donnera une note d'après ce qu'il discerne au sein de la perception globale ; cela justifie que l'on distingue par exemple : une dégustation « acidité », une dégustation « amertume », « viscosité », « fruité », etc...

La dégustation complète d'un produit soumis au jury comprendra donc, selon la nature de ce produit, n dégustations élémentaires. Des exposés très complets, figurant en bibliographie, ont mis en évidence le grand nombre de facteurs de nature physique, chimique, psychique et physiologique intervenant dans une dégustation, avec tous les degrés d'action et toutes les interférences possibles (2-9).

Cet état de choses nous place dans le domaine des effets impliqués par un grand nombre de facteurs plus ou moins indépendants ; c'est-à-dire plus ou moins liés ; ce domaine a fait l'objet d'études particulièrement avancées, mettant en application le calcul des probabilités. Les normes et principes qui résultent de ces travaux ne seront ni présentés ni discutés dans le cadre de l'exposé (1). Il nous suffit avant de les appliquer à la dégustation, de vérifier comme nous l'avons déjà indiqué que cette application est légitime. Nous allons donner le processus d'analyse d'un essai de pratique courante dans le contrôle industriel et l'expérimentation biologique, en prenant le cas général de e échantillons comparables, répétés r fois et soumis à l'appréciation de p dégustateurs.

Chaque participant remplit une fiche de dégustation du type suivant :

Nom du dégustateur.....
Nom du produit.....

Échantillon N°	Note d'acidité	Note de sucré		
1				
2				
3				
.				
.				
.				
n				

(1) Nous renvoyons aux auteurs de méthodologie statistique pour toute discussion ou démonstration de la méthode.

Pour l'analyse des résultats, ces fiches seront transformées selon le code adopté pour le numérotage (1), afin de grouper les notes par échantillon et par répétition. Pour l'étude de l'acidité, par exemple, on aura autant de fiches que de dégustateurs, selon le modèle :

Dégustateur N° I							Dégustateur N° II						
Répétition \ Échantillon	A	B	C	...	Total		Répétition \ Échantillon	A	B	C	...	Total
1	x				R		1					
2							2					
3							3					
.							.					
.							.					
.							.					
Total	V				T_I		Total					T_{II}

La notation est la suivante :

e = nombre d'échantillons.

p = nombre de personnes.

r = nombre de répétitions.

x = une note quelconque (en gusts, ou de 1 à 10... etc...).

V = somme des r notes données à un échantillon par un dégustateur.

W = somme des rp notes données à un échantillon par tous les dégustateurs.

R = somme des e notes données à tous les échantillons d'une répétition par chaque dégustateur.

T = total des notes fournies par un même dégustateur.

Nous appellerons A « le facteur de correction » calculé une fois pour toutes avec la formule :

$$A = \frac{\left(\sum_{0}^{p} T\right)^2}{epr} \qquad \left(\sum_{0}^{p} \text{pris de 0 à } p\right).$$

Les éléments du tableau d'analyse de la variance totale seront calculés successivement, dans l'ordre suivant :

1° *La somme générale des carrés des écarts* :

$$\sum_{0}^{epr} x^2 - A. \qquad (1)$$

2° *La somme des carrés des écarts dus aux répétitions* :

$$\frac{\sum_{0}^{rp} R^2}{e} - \frac{\sum_{0}^{p} T^2}{er}. \qquad (2)$$

(1) Exemple pour 4 échantillons répétés 3 fois : 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
B A C D C B D A B C A D

3° *La somme des carrés des écarts dus aux échantillons* :

$$\frac{\overset{e}{\sum} W^2}{\frac{\circ}{pr}} - A. \qquad (3)$$

4° *La somme des carrés des écarts dus aux dégustateurs* :

$$\frac{\overset{p}{\sum} T^2}{\frac{\circ}{er}} - A. \qquad (4)$$

Le premier terme en a été déjà calculé ci-dessus (2°).

5° *La somme des carrés des écarts dus à l'interaction dégustateurs × échantillons* :

$$\frac{\overset{ep}{\sum} V^2}{\frac{\circ}{r}} - [A + (3) + (4)]. \qquad (5)$$

6° *La part de l'erreur expérimentale* : on l'obtient par différence :

$$(1) - [(2) + (3) + (4) + (5)] \qquad (6)$$

D'où le tableau :

Tableau d'analyse de la variance

Décomposition de la variation totale	Somme des carrés des écarts	Degrés de liberté	Variance	F calculé	F Table Snedecor point 5 %	Signification (seuil 0,05)
Répétitions	(2)	$r-1$				
Échantillons	(3)	$e-1$				
Dégustateurs	(4)	$p-1$				
Interaction	(5)	$(e-1)(p-1)$				
Erreur	(6)	$(p-1)(r-1)$	$E = \frac{(6)}{(p-1)(r-1)}$			
Total	(1)	$epr-1$				

La variance s'obtient en divisant la somme des carrés des écarts par le nombre de degrés de liberté correspondant.

F calculé est le rapport d'une variance à la variance de l'erreur.

Si F de la table de SNEDECOR est inférieur à F calculé, il y a des différences significatives ; on note S (significatif) dans la dernière colonne, sinon on note NS (non significatif).

Lorsque la comparaison de F calculé à F de la table a indiqué une différence significative entre échantillons, entre dégustateurs, ou pour l'interaction, on peut comparer les moyennes des notes obtenues par les échantillons, ou les moyennes des notes fournies par chaque dégustateur, ou les moyennes des « binômes » : tel dégustateur — tel échantillon, cela au moyen des plus petites différences significatives.

a) Comparaison des moyennes des notes des *échantillons* : plus petite différence significative : $ppds = t_o s_d$
où : $-t_o$ se lit dans la table de t, colonne du seuil 0,05 pour le nombre de degrés de liberté affecté à l'erreur :

$$(p - 1)\,(r - 1)$$

$-s_d$ écart-type de la différence entre deux moyennes est donné par la formule :

$$s_d = \sqrt{2\,\frac{E}{p \cdot r \cdot}}$$

car un échantillon figure pr fois dans la dégustation totale.

b) Comparaison des moyennes des notes des *dégustateurs* :
De la même manière :

$$ppds = t_0 s'_d \quad \text{avec ici} \quad s'_d = \sqrt{2\,\frac{E}{er}}.$$

Le nombre de notes données par chaque dégustateur est en effet égal à er.

c) Comparaison entre les moyennes des notes données par une personne à un échantillon (mise en évidence de l'*interaction* : échantillons × dégustateurs).

On dresse le tableau :

Échantillon / Dégustateur	A	B	C	. . .
I	Z			
II				
.				
.				
.				

Puis on calcule, comme précédemment, la plus petite différence entre ces moyennes Z :

$$ppds = t_0 \sqrt{2\,\frac{E}{r}}.$$

Si Z varie significativement dans une même colonne, celle de l'échantillon B par exemple, il est clair que les avis sont partagés sur B. Mais l'unanimité des jugements peut être faite sur l'échantillon C : c'est le signe que ce dernier réagit beaucoup moins selon les personnes que ne l'a fait B.

Si maintenant Z varie significativement dans une même ligne du tableau : le dégustateur en question est très sensible aux différences entre échantillons ; si son jugement concorde avec le résultat général, il est un excellent dégustateur pour cette expérience, sinon ses réponses sont plutôt fantaisistes. En outre, un dégustateur pour lequel rien ne varie alors qu'on a mis en évidence des différences significatives générales entre échantillons est un mauvais réactif en la matière.

Enfin, la répétition de ce type d'expérience peut amener un dégustateur à constater que ses notes sont constamment trop faibles — ou trop élevées —

par rapport à la moyenne générale : il pourra à l'avenir rectifier non son jugement, mais son mode de notation, de manière à parfaire son éducation.

A noter qu'il est possible par ce moyen de pratiquer une sélection rationnelle des membres d'un jury, tout comme on sélectionne finalement les échantillons : il y a réversibilité parfaite entre les personnes et les produits à déguster : la forme mathématique de l'analyse le montre bien, et l'on peut considérer en somme toute note donnée comme le résultat d'une rencontre entre un dégustateur et un échantillon.

Ce schéma expérimental correspond à un essai bloc classique : il est possible de le perfectionner encore, par exemple de le mettre en carré latin, si l'expérience montre que l'ordre de dégustation a un effet sur le classement. Cette transposition se fait sans difficulté : on aurait alors autant de répétitions que d'échantillons, mais on ne saurait aller très loin dans cette voie, en raison de la fatigue des sens qui peut devenir prohibitive.

c) **Classements**

Lorsqu'il n'est pas possible de noter de façon scalaire les échantillons, ou lorsque la distribution des notes n'est pas ajustable à la loi normale, on peut parfois procéder, sans faire de répétitions, à un classement des échantillons, du meilleur au moins bon, ou du plus caractérisé au moins caractérisé.

On disposera dans ces conditions d'autant de classements qu'il y a de dégustateurs, et la comparaison des n échantillons pourra se faire d'après le total des places, mais il est nécessaire de s'assurer de l'homogénéité de perception du jury lorsque celui-ci est peu nombreux en face d'un bon nombre d'échantillons. A cet effet, on peut utiliser soit le test de χ^2 soit le coefficient de corrélation des rangs (18). Mais dans le classement final des échantillons selon leur place moyenne, il sera difficile d'affirmer si tel produit mérite la place qu'il a, s'il a été favorisé ou défavorisé par le hasard.

Dans le but de préciser si le classement respectif de 2 échantillons est « significatif » — ce qui revient à rechercher les ex-aequo — il a été imaginé de faire déguster un petit nombre d'échantillons à de nombreuses personnes et de conduire l'interprétation en 2 temps (13) :

I. Recherche d'une différence significative entre la « somme » des places obtenues par chaque échantillon et la somme attendue par le fait d'une sélection au hasard. Avec p dégustateurs et e échantillons, cette dernière somme serait :

$$S = \frac{p}{e}\,[e + (e-1) + (e-2) + \cdots 3 + 2 + 1] = \frac{p}{e} \cdot \frac{e(e+1)}{2} = \frac{1}{2}\,p(e+1).$$

soit, pour $p = 20$ et $e = 5$, $S = 60$.

On applique alors le critère χ^2 de PEARSON. S'il y a une différence significative au sein des e échantillons, on la recherche systématiquement en comparant les échantillons 2 par 2, par exemple en comparant d'abord B et C, supposés classés premier et dernier. Le tableau des résultats permet de savoir combien de fois B a été classé avant C et combien de fois après.

II. On opère alors comme pour un essai de dégustation comparée de deux échantillons, ce qui ramène au cas déjà vu ci-dessus (*a*) Comparaison). La table de BENGTSSON permet de résoudre immédiatement le problème.

CONCLUSION

Ces considérations sur la conduite rationnelle d'une dégustation n'ont d'autre but que de mettre en relief la valeur expérimentale d'un examen organoleptique, conçu pour pouvoir discerner l'influence du hasard sur les résultats obtenus.

La multiplicité des applications montre aussi que les problèmes qui se posent à l'expérimentateur sont assez variés et nécessitent des solutions parfois complexes. Dans tous les cas, on ne saurait interpréter un essai quelconque, aussi élémentaire soit-il, sans s'assurer que toutes les précautions ont été prises pour que les résultats soient valables.

Ainsi comprise, l'utilisation correcte de tels schémas doit être un instrument de premier ordre dans la recherche de produits de qualité améliorée (légumes, fruits, etc...) ou de meilleurs procédés de transformation (boissons... etc...).

Ces méthodes intéressent en définitive aussi bien le sélectionneur que le technologue.

BIBLIOGRAPHIE

(1) AMERINE (M. A.). — The influence of the constituents of wines on taste and application to the judging of commercial wines. Proc. Wine Technology conference University of California, 1949.
AMERINE (M. A.). — An application of triangular taste testing to wines. *The wine Review*, 1948, **16,** (5) 10.
AMERINE (M. A.) et ROESSLER (E. B.). — Techniques and problems in the organoleptic examination of wines. Proc. Wine Technology conference University of California, 1953.
(2) GOETZL (F. R.). — Studies on human appetite.Proc. Wine Technology conference University of California, 1949.
(3) BEEBE-CENTER et WADDEL. — A general psychological scale of taste. *J. Of.*, ps., 1948, 26, 517.
(4) BEEBE-CENTER et WADDEL. — Standards for use of the gust scale. *J. Of.*, ps., 1949, 28, 411.
(5) BENGTSSON (K.). — Taste testing as an analytical method statistical treatment of the data. *Wallerstein Lab. Comm.*, septembre 1953, p. 231.
(6) BENGTSSON (K.) et HELM (E.). — Principles of taste testing. *Wallerstein Lab. Comm.*, décembre 1946, nº 28, p. 171.
(7) BYER (A. J.) et ABRAMS (D.). — A comparison of the triangular and two-sample taste test methods. *Wallerstein Lab. Comm.*, septembre 1953, p. 253.
(8) BYER (A. J.) et GRAY (P. P.). — Some consideration in applying systematic taste testing to beer. *Wallerstein Lab. Comm.*, décembre 1953, p. 303.
(9) CALVAT (J.). — Principes de la dégustation. O. I. V. , mai 1939, TI, p. 87.
(10) DALMASSO. — Établissement d'un vocabulaire international unifié des termes d'appréciation pour la dégustation. B. O. I. V., novembre 1949, nº 225, p. 33.
(11) DE CLERCK (J.). — Cours de Brasserie, 1948. Imprimerie Van Linthout, Louvain.
(12) GOT (N.). — La dégustation, 1950.
(13) GRAY (P. P.). Modern taste testing from the viewpoint of the master brewer, *Wallerstein Lab. Comm.*, décembre 1954, p. 241.

(14) HELM (E.) et TROLLE (B.). — Selection of a taste panel. *Wallerstein Lab. Comm.*, décembre 1946, p. 181.
(15) LE MAGNEN (J.). — Le goût et les saveurs. Presses universitaires.
(16) LE MAGNEN (J.). — Odeurs et parfums. Presses universitaires.
(17) MARTEAU (G.). — Recherche de la qualité par l'examen organoleptique des vins. *Le Progrès Agricole et Viticole*, 1953, nº 46-47-48, pp. 281 et 310.
(18) VESSEREAU (A.). — Méthodes statistiques en biologie et en agronomie. *Nouvelle encyclopédie agricole*, J. B. Baillière et fils, Paris 1948.

NOMENCLATURE DES LEVURES DU VIN

PAR

P. GALZY

Laboratoire de Recherches de Technologie, Ecole Nationale d'Agriculture de Montpellier, Centre de Recherches Agronomiques du Midi.

L'évolution de la classification des levures a fait l'objet d'un premier article bibliographique (1) qui avait pour but de montrer l'instabilité relative de cette classification durant ces dernières années et d'exposer l'état actuel de cette question.

Cette revue permet de prévoir qu'une même levure pourra se trouver sous des noms différents suivant les auteurs et les époques de parution de leurs divers travaux.

Nous avons jugé utile de relever dans la littérature œnologique, les noms de levures citées afin d'en établir les synonymes et de faciliter la recherche des noms corrects de ces diverses espèces en fonction de la nouvelle classification de LODDER et KREGER VAN RIJ.

Le résultat de ce travail a été résumé ici sous forme d'index alphabétique.

Tous les noms de genres et d'espèces que nous avons pu rencontrer se trouveront dans l'ordre alphabétique : après un nom périmé, sera indiqué le nom correct de l'espèce.

Après un nom correct, sera indiquée la liste de tous les synonymes que nous avons trouvés dans des travaux d'ordre œnologique.

En outre, il sera donné un bref aperçu sur l'intérêt œnologique de l'espèce.

La description botanique des genres sera également donnée dans ce tableau.

Les noms corrects adoptés par LODDER et KREGER VAN RIJ seront soulignés.

Brettanomyces Kufferath et Van Laer.

Cellules ovales ou rondes, souvent en ogives, parfois allongées.

Reproduction par bourgeonnement multilatéral d'où formation de chaines irrégulières de cellules. Un pseudomycelium primitif ayant rarement des blastospores attachées, peut être formé.

Sur extrait de malt, il se forme un dépôt et parfois un voile. La croissance est lente, il y a apparition d'un parfum spécial.

En aérobiose, il y a production d'acides à partir des sucres : l'addition de CO_3Ca au milieu est donc recommandée.

Outre le catabolisme oxydatif, il peut y avoir fermentation.

(1) Position des levures du vin dans la systématique. 1ere Partie : Évolution de la classification des levures. *Ann. Techn.* de l'INRA, p. 417, 1955.

— *Brettanomyces bruxellensis* Kufferath et Van Laer.

D'après FLORENZANO (1), cette espèce n'a qu'un intérêt œnologique limité, car elle produit beaucoup d'acidité volatile. Elle pourrait donner une véritable piqûre des vins d'après SCHANDERL.

Synonymes : *Mycotorula intermedia* Krumbholz et Tauschanoff.

— *Brettanomyces custersii*,
Description insuffisante ; ce nom est à rejeter.

— *Brettanomyces italicus* VERONA et FLORENZANO.
Synonyme : *Torulopsis bacillaris* (KROEMER et KRUMBHOLZ) LODDER.

— *Brettanomyces lambicus* Kufferath et Van Laer.

Cette espèce ne peut donner plus de 7 ou 8 p. 100 d'alcool et produit par contre au cours de la fermentation, beaucoup d'acidité volatile, d'après FLORENZANO (1).

— *Brettanomyces patavinus*.
Description insuffisante, ce nom est à rejeter.

Candida Berkhout

Cellules de formes variables, reproduction par bourgeonnement multilatéral. Chlamydospores peuvent être présentes. Pseudomycelium plus ou moins abondemment développé ; en outre, un vrai mycelium peut se former. Les blastospores peuvent être rattachées au pseudomycelium d'une façon caractéristique de l'espèce. En milieu liquide, croissance importante, souvent, formation d'un anneau et d'un voile.

Outre le métabolisme oxydatif, il y a dans certaines espèces, un métabolisme fermentatif.

— *Candida albicans* (ROBIN) Berkhout.

Cette espèce a été trouvée dans les vins par MRAK et MAC CLUNG (2).

— *Candida brumptii* LANGERRON et GUERRA.

Cette espèce a été décrite par CASTELLI (3) et se trouve assez rarement dans le vin. Elle a été aussi trouvée par CAPRIOTTI (4).

— *Candida guilliermondii* (CASTELLI) Langeron et Guerra.

D'après CAPPRIOTTI (4), cette espèce ne peut donner plus de 3 à 4 p. 100 d'alcool en volume.

— *Candida Krusei* (CASTELLI) BERKHOUT.

Cette espèce a été signalée dans les vins par MRAK et MAC CLUNG (2).
Synonymes :
Mycoderma bordetii Kufferath.
Candida monosa (KLUYVER) DIDDENS et LODDER.

— *Candida monosa* (KLUYVER) DIDDENS et LODDER.

Synonymes : *Candida Krusei* (CASTELLI) BERKHOUT.

— *Candida mycoderma* (RESS) Nov. Comb.

Candida mycoderma est l'agent de la maladie de la « fleur ». Cette espèce a été désignée dans de nombreux travaux sous le nom de Mycoderma vini. Elle est très répandue dans les vins, lorsque le ouillage a été défectueux.

Synonymes :
Mycoderma vini Desmazières sensu LODDER.
Mycoderma duplex de ROSSI.
Mycoderma tenax de ROSSI.
Saccharomyces mycoderma REESS.
Mycoderma vini de ROSSI.
Mycoderma acidificans de ROSSI.
Mycoderma cerevisiae DESMAZIÈRES.

— *Candida pulcherrima* (LINDNER) Windisch.

Dans un moût de raisin cette espèce ne donne que 2° d'alcool d'après MALAN (5).

Synonymes :
Torolopsis pulcherrima (LINDNER) SACCARDO.
Torulopsis pulcherrima (LINDNER) SACCARDO. Var. *rubra* CASTELLI.

— *Candida rugosa* (ANDERSON) DIDDENS et LODDER.

Cette espèce se trouve rarement dans les vins. Elle a été signalée en Californie par SCHEFFER et MRAK (6).

— *Candida tropicalis* (CAST) BERKHOUT.

D'après SCHANDERL (7), *Candida tropicalis* forme un voile sur le moût, puis fermente lentement en donnant au plus 5° d'alcool.

Synonymes :
Candida vulgaris BERKHOUT.
Monilia candida BONORDEN.
— *Candida vulgaris* BERKHOUT.

Synonymes : *Candida tropicalis* (CASTELLI) BERKHOUT.

Cryptococcus Kützing emend. VUILLEMIN

Reproduction par bourgeonnement multilatéral. Les cellules sont entourées par une capsule. Sous certaines conditions, un composé type amidon est formé dans les capsules et dans le milieu.

Pseudomycelium absent ou rudimentaire. Les cultures sur milieu solide ont un aspect muqueux.

En milieu liquide, formation d'un anneau, parfois d'un voile ; parfois, le contenu du flacon entier prend en masse visqueuse. Il n'y a jamais fermentation des sucres.

— *Cryptococcus albidus* (SAITO) SKINNER.

Cette espèce, assez rare, n'a aucun intérêt œnologique puisqu'elle ne donne pas de fermentation. Elle a été trouvée par MALAN (5) dans le Piemont.

Synonymes :
Torulopsis albida (SAITO) LODDER.
Torulopsis acris var. *granulosa* MARCILLA et FEDUCHY.
— *Cryptococcus bacillaris* (KROEMER et KRUMBHOLZ) SKINNER.

Synonyme : *Torulopsis bacillaris* (KROEMER et KRUMBHOLZ) LODDER.

Debaryomyces LODDER et VAN RIJ, nom conserv.

Cellules rondes, courtes-ovales ou ovales-allongées. Reproduction végétative par bourgeonnement multilatéral. Un pseudomycelium se forme, très primitif, parfois bien développé, plus souvent absent. Les cellules végétatives sont haploïdes, une conjugaison hérétogamique précède immédiatement la formation des asques ; une cellules se conjugue avec son propre bourgeon ; quelquefois il y a une conjugaison isogamique, parfois, aussi, la conjugaison ne précède pas immédiatement la formation de l'asque. Les spores sont rondes avec en général, une goutte d'huile au centre. Parfois, la spore a une membrane d'aspect verruqueux.

En général, une spore par asque, parfois, 2, exceptionnellement 4. En milieu liquide, il se forme parfois, un voile mât, sec, plissé, mais souvent il ne se forme pas.

Fermentation : nulle ou très faible.

Nitrate non assimilé.

— *Debaryomyces kloeckeri* GUILLIERMOND et PEJU.

Cette espèce, trouvée en Californie, par MRAK et MAC CLUNG (2) est très rarement présente sur le raisin et dans le vin puisqu'elle n'a été trouvée qu'une seule fois.

Endomyces REESS

Aucune levure appartenant réellement à ce genre n'a été trouvée dans le vin.
— *Endomyces vernalis* LUDWIG.

Synonymes : *Trichosporon pullulans* (LINDNER) DIDDENS et LODDER.

Hanseniaspora ZIKES

Cellules en citron, ovales ou ovales-allongées.

Reproduction végétative par bourgeonnement bipolaire. Pas de formation de pseudomycelium. Les spores sont sphériques ou en chapeau. Un à 4 spores par asque. La possibilité de sporuler se perd par culture prolongée.

Fermentation possible. Pas d'assimilation du nitrate de potassium.

— *Hanseniaspora apuliensis*,
description insuffisante, ce nom est à rejeter.
— *Hanseniaspora Guilliermondii* PIJPER.

Synonymes : *Hanseniaspora Valbyensis* KLÖCKER.

— *Hanseniaspora Valbyensis* KLÖCKER.

Cette espèce est appelée parfois : *Hanseniaspora guilliermondii*, PIJPER. Elle se trouve surtout dans les pays chauds (Sicile, Israël) d'après CASTELLI (8).
Elle peut produire jusqu'à 9°5 d'alcool en volume.
Synonymes : *Hanseniaspora guilliermondii* PIJPER.

Hansenula H. et P. SYDOW

Cellules de formes ovales, rondes ou allongées.
Reproduction végétative par bourgeonnement multilatéral.
Formation d'un pseudomycelium fréquente.
Une conjugaison hétéro ou isogamique précède ou ne précède pas immédiatement la formation des asques.
1 à 4 spores par asque. Spore en forme de chapeau, anneau de saturne ou sphérique.
En milieu liquide, il se forme un voile sec et mât, bien qu'il puisse être parfois peu développé et même absent. Fermentation ; assimilation des nitrates. Attaque de l'arbutine. Production d'ester.

— *Hansenula anomala* (HANSEN) H. et P. SYDOW.

Cette espèce a été trouvée dans les vins assez souvent par SCHANDERL (7).
Synonymes :
Willia anomala HANSEN.
Hansenula panis CASTELLI.
Hansenula nivea CASTELLI.
— *Hansenula nivea* CASTELLI.

Synonymes : *Hansenula anomala* (HANSEN) H. et P. SYDOW.

— *Hansenula panis* CASTELLI.

Synonymes : *Hansenula anomala* (HANSEN) H. et P. SYDOW.

— *Hansenula saturnus* (KLOCKER) H. et P. SYDOW.

Cette espèce a été trouvée et étudiée par SCHANDERL (7).
Elle se trouve surtout dans des vins provenant de vendanges tardives ou passerillées et fermentant lentement.
Synonymes : *Willia saturnus* (KLÖCKER) HANSEN.

Kloeckera JANKE

Cellules en citron, ovales ou en saucisses, bourgeonnement bipolaire. Parfois, pseudomycelium très primitif.

Fermentation du glucose ou du glucose et saccharose.

Le nitrate n'est pas assimilé. Il y a rarement une croissance sur Ethanol comme seule source de carbone.

— *Kloeckera africana* (Klöcker) Janke.

Cette espèce a été signalée dans les vins de Californie par Mrak et Mac Clung (2).

—*Klöeckera apiculata* (Reess Edmend. Klöcker) Janke.

Sous le nom de levure apiculée, cette espèce a été très étudiée en œnologie (Ventre-Semichon) ; elle donne une fermentation qui s'arrête en général pour 4 p. 100 d'alcool.

D'après T. Castelli (3), certaines souches pourraient atteindre parfois 7°.

Synonymes :

Saccharomyces apiculatus (Reess).

Pseudosaccharomyces apiculatus (Reess) Klöcker.

Klöeckerpora uvarum Niehaus.

— *Klöeckera corticis* (Klöcker) Janke.

Cette espèce se trouve dans la région de Trévise où elle a été trouvée par Capriotti et Cantarelli (9). Elle peut donner jusqu'à 9 à 10 p. 100 d'alcool en volume.

— *Kloeckera jensenii* (Klöcker) Janke.

K. Jensenii a été trouvée par Verona en Sardaigne (10).

— *Kloeckera magna* (De Rossi) Janke.

Dans les expériences de Capriotti (4) ; cette espèce n'a jamais donné plus de 7°5 d'alcool. D'après Castelli (8), elle pourrait atteindre 10°.

Synonymes :

Pseudosaccharomyces magnus De Rossi.

Kloeckeraspora osmophila.

Monilia Persoon

Ce genre a disparu de la classification.

— *Monilia candida* Bonorden.

Synonymes : *Candida tropicalis* (Castelli) Berkhout.

— *Monilia vini*,

description insuffisante, ce nom est à rejeter.

Mycoderma Persoon

Ce genre a disparu de la classification.

— *Mycoderma acidificans* de Rossi.

Synonymes : *Candida mycoderma* (Reess) Nov. Comb.

— *Mycoderma bordettii* KUFFERATH.

Synonymes : *Candida krusei* (CASTELLI) BERKHOUT.

— *Mycoderma cerevisiae* DESMAZIÈRES.

Synonymes : *Candida mycoderma* (REESS) Nov. Comb.

— *Mycoderma duplex* de ROSSI.

Synonymes : *Candida mycoderma* (REESS) Nov. Comb.

— *Mycoderma vini* DE ROSSI.

Synonymes : *Candida mycoderma* (REESS) Nov. Comb.

— *Mycoderma vini* DESMAZIÈRES SENSU LODDER.

Synonymes : *Candida mycoderma* (REESS) Nov. Comb.

Mycotorula WILL

Ce genre a disparu de la classification.

— *Mytocorula intermedia* KRUMBHOLZ et TAUSCHANOFF.

Synonymes : *Brettanomyces bruxellensis* Kufferath et VAN LAER.

Pichia HANSEN

Cellules de formes variables, ovales à cylindriques allongées. Reproduction végétative par bourgeonnement multilarétal. Formation d'un pseudomycelium. Une conjugaison hétérogamique précède ou non la formation des asques. Les spores sont hémisphériques, en chapeau angulaires ou rondes, en général avec une goutte d'huile au milieu. Une à 4 spores par asque.

En milieu liquide, un voile sec et mât est formé.

Le métabolisme est surtout oxydatif, mais la fermentation est possible. Nitrate non assimilé.

Attaque de l'arbutine : nulle ou très faible.

— *Pichia farinosa* (LINDNER) HANSEN.

Autrefois classé dans les *zygopichia*. Cette espèce a été signalée dans les vins par SCHANDERL.

— *Pichia fermentans* LODDER.

Signalé pour la première fois dans les vins par PEYNAUD et Mlle DOMERCQ (11), *Pichia fermentans* donne une fermentation très lente et peut donner 7 à 8° d'alcool seulement en un mois. Au bout de ce temps, la fermentation paraît durer encore.

— *Pichia membranaefaciens* HANSEN.

Cette espèce se trouve parfois dans les moûts en début de fermentation. Elle a été trouvée notamment par SCHEFFER et MRAK (6).

Synonymes : *Zypopichia chiantigiana* CASTELLI.

— *Pichia uvarum*.

Description insuffisante, ce nom est à rejeter.

Pseudosaccharomyces KLÖCKER

Ce genre a disparu de la classification.

— *Pseudosaccharomyces apiculatus* (REESS) KLÖCKER.

Synonymes : *Kloeckera apiculata* (REESS EMEND KLÖCKER) JANKE.

— *Pseudosaccharomyces magnus* DE ROSSI.

Synonymes : *Kloeckera magna* (DE ROSSI) JANKE.

Rhodotorula HARRISSON

Cellules rondes ovales ou allongées.

Reproduction par bourgeonnement multilatéral ; parfois, un pseudomycelium plus ou moins primitif.

Production de pigments jaunes ou rouges, pas de fermentation.

— *Rhodotorula aurantiaca* (SAITO) LODDER.

Cette espèce est assez rare : elle a été signalée en Vénétie par CAPRIOTTI (4).

— *Rhodotorula glutinis* (FRES.) HARRISON.

Cette espèce a été signalée par MRACK et MAC CLUNG en Californie. Elle ne joue aucune rôle en vinification.

— *Rhodotorula mucilaginosa* (JÖRG.) HARRISON.

Cette espèce a été trouvée sur des raisins par MRAK et MAC CLUNG (2) en Californie, puis par PEYNAUD et Mlle DOMERCQ dans le Bordelais (11).

— *Rhodotorula pallida* LODDER.

Cette espèce a été trouvée en Calabre par CAPRIOTTI (4).

— *Rhodotorula rubra* (DEMME) LODDER.

Cette espèce a été signalée assez souvent notamment en Vénétie par CAPRIOTTI (4).

Saccharomyces (MEYEN) REESS

Cellules de formes variables : rondes ovales, allongées.

Reproduction végétative par bourgeonnement multilatéral.

Un pseudomycelium peut être formé.

La formation des asques est précédée ou non par une conjugaison iso ou hétérogamique. Des protubérances ressemblent à des tubes de conjugaison peuvent se former.

Les spores sont rondes ou ovales, quelques fois en chapeau, angulaires, ou reniformes.

En général, 1 à 4 spores par asque ; les spores peuvent se conjuguer.

En milieu liquide croissance importante, souvent formation d'un anneau et croissance en surface après un temps très long.

S'il est présent, le voile n'est pas du type sec, mat et plissé. Fermentation vigoureuse du glucose et souvent d'autres sucres. Pas d'assimilation des nitrates.

— *Saccharomyces acidifaciens* (NICKERSON) Nov. Comb.

Décrite sous le nom de *Saccharomycodes mestris* MARCILLA et FEDUCHY par le Pr MARCILLA et ses collaborateurs, cette espèce se caractérise par une résistance exceptionnelle à l'anhydride sulfureux. D'où son intérêt pour la fermentation des moûts très sulfites ; elle ne produit que 8,8 p. 100 d'alcool en volume (12).

Synonymes : *Saccharomycodes mestris* MARCILLA et FEDUCHY.

— *Saccharomyces apiculatus* REESS.

Synonymes : *Kloeckera apiculata* (REESS EMEND. KLÖCKER) JANKE.

— *Saccharomyces bacillaris* KROEMER et KRUMBHOLZ.

Synonymes : *Torulopsis bacillaris* (KROEMER et KRUMBHOLZ) LODDER.

— *Saccharomyces baillii* LINDNER.

Cette espèce donne, d'après CAPRIOTTI (4) des fermentations qui ne dépasent guère 8 p. 100 d'alcool dans des moûts enrichis à 28 p. 100 de sucre.

Synonymes : *Zygosacchoromyces bailii* (LINDNER) GUILLIERMOND.

— *Saccharomyces bayanus* SACCARDO.

T. CASTELLI (13) a obtenu avec cette espèce, des fermentations normales avec production de 14°5 d'alcool.

Elle ne pourrait produire jusqu'à 18 p. 100 d'alcool en volume d'après E. DEL GIUDICE (14). Ces auteurs ont opéré avec des moûts très riches en sucre (30 p. 100).

— *Saccharomyces beticus* race γ de MARCILLA.

Synonymes : *Saccharomyces fermentati* (SAITO) Nov. Comb.

— *Saccharomyces beticus* races α et β MARCILLA.

Dénomination à abandonner.

— *Saccharomyces bisporus* (NAGANISHI) Nov. Comb.

Cette espèce a été étudiée par MALAN (5). Elle n'a jamais donné plus de 6° d'alcool en 45 jours de fermentation dans des moûts de densité 1.128.

Synonymes : *Zygosaccharomyces bisporus* NAGANISHI.

— *Saccharomyces carlsbergensis* HANSEN.

D'après CASTELLI (13), cette espèce peut pousser des fermentations jusqu'à 15°, dans des moûts très sucrés (30 p. 100 environ).

Synonymes :

Saccharomyces intermedius HANSEN Var. *Valdensis* OSTERWALDER.

Saccharomyces carlsbergensis HANSEN Var. *Valdensis* (OSTERWALDER)-DEKKER.

— *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN Var. *ellipsoideus* (HANSEN) DEKKER.

Cette espèce est la levure la plus typique du vin. Très alcooligène, à développement très rapide, elle a donné les souches utilisées pour le levurage depuis très longtemps.

Elle est trop connue pour que l'on cite des propriétés.

Synonymes : *Saccharomyces ellipsoïdeus* HANSEN.

— *Saccharomyces cheresiensis* Prostosserdow et Afrikian.

Synonymes : *Saccharomyces oviformis* Osterwalder.

— *Saccharomyces chevalieri* GUILLIERMOND.

Saccharomyces chevalieri peut produire plus de 15 p. 100 d'alcool en volume d'après E. DEL GIUDICE (14) dans des moûts enrichis en sucre jusqu'à 30 p. 100.

Synonymes :

Saccharomyces lindneri GUILLIERMOND.

Saccharomyces mangini GUILLIERMOND.

— *Saccharomyces chevalieri* GUILLIERMOND var. *torulosus* (Osterwalder) DEKKER.

Synonymes : *Saccharomyces rosei* (GUILLIERMOND) Nov. Comb.

— *Saccharomyces chodati* STEINER.

Synonymes : *Saccharomyces steineri* Nov. Spec.

— *Saccharomyces delbrueckii* LINDNER var. *mongolicus* (SAITO) Nov. Var.

D'après Capriotti (4), cette espèce pourrait produire jusqu'à 14° d'alcool dans des moûts à 29 p. 100 de sucre.

Synonymes : *Saccharomyces globosus* Osterwalder.

— *Saccharomyces ellipsoïdeus* HANSEN.

Synonymes : *Saccharomyces cerevisiae* (HANSEN) Var. *ellipsoïdeus* (HANSEN) DEKKER.

— *Saccharomyces exiguus* HANSEN.

Cette espèce a produit près de 14 p. 100 d'alcool en volume dans les expériences de CAPRIOTTI (4), dans des moûts à 29 p. 100. de sucre

— *Saccharomyces fermentati* (SAITO) Nov. Comb.

Cette espèce a été étudiée sous le nom de *Saccharomyces beticus* race γ par

MARCILLA et FEDUCHY (15) puis par FORNACHON (16). Elle donne des voiles à la surface des vins, produisant ainsi une diminution de teneur en alcool éthylique en alcools supérieurs, en glycérine et en acides volatiles (SCHANDERL).

Il y a formation d'esters volatils et d'aldéhydes. Cette espèce est à la base de la production des vins du type Xéres.

BOBADILLA (25) pense qu'elle pourrait être utilisée pour dépiquer les vins par voie biologique.

Synonymes :

Torulaspora fermentati SAITO.

Saccharomyces beticus race γ de MARCILLA.

— *Saccharomyces florentinus* (CASTELLI) Nov. Comb.

Dans les expériences de E. DEL GIUDICE (14) *S. florentinus* n'a donné que 9°5 d'alcool en volume dans des moûts enrichis en sucre jusqu'à la concentration de 30 p. 100.

Synonymes : *Zygosaccharomyces florentinus* CASTELLI.

— *Saccharomyces fructuum* Nov. Spec.

Cette espèce peut donner 14°5 d'alcool d'après T. CASTELLI (13) dans des moûts riches en sucre (30 p. 100 environ).

— *Saccharomyces globiformis*.

Description insuffisante, ce nom est à rejeter.

— *Saccharomyces globosus* Osterwalder.

Synonymes : *Saccharomyces delbrueckii* LINDNER Var. *mongolicus* (SAITO) Nov. Var.

— *Saccharomyces gracilis* subsp. *beticus*.

Description insuffisante, ce nom est à rejeter.

— *Saccharomyces heterogenicus* Osterwalder.

Isolée par C. E. MALAN (5), d'un vin Piémontais, *Saccharomyces heterogenicus* a produit 11° 9 d'alcool dans un moût de densité 1128.

— *Saccharomyces intermedius* HANSEN.

Synonymes : *Saccharomyces willianus* Saccardo.

— *Saccharomyces intermedius* HANSEN Var. *turicensis* Osterwalder.

Synonymes : *Saccharomyces uvarum* Beijerinck.

— *Saccharomyces intermedius* HANSEN Var. *valdensis* Osterwalder.

Synonymes : *Saccharomyces carlsbergensis* HANSEN.

— *Saccharomyces italicus* CASTELLI.

Cette espèce peut produire jusqu'à 15° d'alcool d'après E. DEL GIUDICE (14) dans des moûts à 30 p. 100 de sucre.

— *Saccharomyces lindneri* GUILLIERMOND.

Synonymes : *Saccharomyces chevalieri* GUILLERMOND.

— *Saccharomyces mangini* GUILLERMOND.

Synonymes : *Saccharomyces chevalieri* GUILLIERMOND.

— *Saccharomyces mycoderma* REESS.

Synonymes : *Candida mycoderma* (REESS) Nov. Comb.

— *Saccharomyces nadsoni*.

Description insuffisante, ce nom est à rejeter.

— *Saccharomyces oviformis* Osterwalder.

Sur des moûts riches en sucre (30 p. 100 environ) CASTELLI (13) a obtenu la production de 12°5 d'alcool.

Synonymes : *Saccharomyces cheresiensis* Prostosserdow et Afrikian.
Saccharomyces oviformis Osterwalder Var. *bisporus* CASTELLI.

— *Saccharomyces pastorianus* HANSEN.

Cette espèce a été trouvée fréquemment par RENAUD (17) dans des vins en fin de fermentation de la Vallée de la Loire.

— *Saccharomyces prioranus*.

Description insuffisante, ce nom est à rejeter.

— *Saccharomyces rosei* (GUILLIERMOND) Nov. Comb.

CANTARELLI (18) a montré que cette espèce pourrait produire jusqu'à 10 p. 100 d'alcool en volume en ne donnant que très peu d'acidité volatile dans un moût contenant 23 p. 100 de sucre.

Synonymes :
Torulaspora rosei GUILLIERMOND.
Saccharomyces torulosus OSTERWALDER.
Zygosaccharomyces globiformis KROEMER et KRUMBHOLZ.
Saccharomyces chevalieri GUILLIERMOND Var. *torulosus* (Osterwalder) DEKKER.

— *Saccharomyces rouxii* Boutroux.

KROEMER et KRUMBHOLZ (19) ont montré la résistance de cette espèce aux hautes concentrations en sucre. Ils l'ont isolée de moût provenant de vendange parsserillée.

SACCHETI (20) a trouvé cette espèce dans les mêmes conditions.

Synonymes :
Zygosaccharomyces variabilis KROEMER et KRUMBHOLZ.
Zygosaccharomyces gracilis KARAMBOLOFF et KRUMBHOLZ.
Zygosaccharomyces vini NAGANISHI.

— *Saccharomyces rouxii* Boutroux. Var. *polymorphus* (KROEMER et KRUMOBHLZ) Nov. Var.

Synonymes :
Zygosaccharomyces polymorphus KROEMER et KRUMBHOLZ.
Zygosaccharomyces felsineus SACCHETI.
Zygosaccharomyces barkeri SACCARDO et SYDOW.

— *Saccharomyces stéineri* Nov. Spec.

CAPRIOTTI et CANTARELLI (9) ont obtenu avec cette espèce la production de 12 à 13° d'alcool avec des moûts à 29 p. 100 de sucre. MALAN (5) a obtenu 15° d'alcool dans la fermentation d'un moût très sucré et titrant 17° en puissance.

Synonymes : *Saccharomyces chodati* STEINER.

— *Saccharomyces torulosus* Osterwalder.
Synonymes : *Saccharomyces rosei* GUILLIERMOND Nov. Comb.

— *Saccharomyces uvarum* BEIJERINCK.

Cette espèce d'après C. E. MALAN, est très fréquente dans les vins (5). Elle peut donner une fermentation avec une production d'alcool de 11 p. 100 en volume en 45 jours dans un moût de densité : 1128.

Synonymes :
Saccharomyces validus HANSEN pro parte.
Saccharomyces intermedius HANSEN. var. *turicensis* Osterwalder.

— *Saccharomyces validus* HANSEN.

Cette ancienne espèce est à rattacher en partie à *Saccharomyces willianus* SACCARDO. et en partie à *Saccharomyces uvarum* BEIJERIRK.

Saccharomyces veronae Nov. Spec.

D'après VERONA (10), cette espèce fermenterait en ne donnant que très peu d'acidité volatile.

Saccharomyces willianus SACCARDO.

CAPRIOTTI (4) a constaté que cette espèce pouvait produire jusqu'à 14° d'alcool dans des moûts enrichis en sucre jusqu'à 29 p. 100.

Synonymes :
Saccharomyces intermedius HANSEN.
Saccharomyces validus HANSEN pro parte.

Saccharomycodes HANSEN

Cellules en citron ou en saucisses.

Reproduction végétative par bourgeonnement à des pôles sur une grande base.

Pseudomycelium peu développé.

Les spores sont rondes et lisses, 4 par asque. Elles se conjuguent par paires.

En milieu liquide, il se forme un dépôt et un anneau.

Fermentation. Le nitrate n'est pas assimilé.

— *Saccharomycodes behrensianus* (BEHRENS) KLÖCKER.

Est peut être à rattacher à *Saccharomyces Rouxii* Boutroux Var. *polymorphus* (KROEMER et KRUMBHOLZ) Nov. Var., la description donnée peut se rapporter à un *Saccharomyces* ou à un *Saccharomycodes*.

— *Saccharomycodes bisporus* CASTELLI.

Cette espèce a été trouvée et décrite pour la première fois par CASTELLI (21).

— *Saccharomycodes ludwigii* HANSEN.

KROEMER et HEINRICH (22) ont décrit une variété « vini » de cette espèce qui résiste à des teneurs importantes d'anhydride sulfureux.

MALAN (5) l'a trouvée dans des vins de Piemont ; elle a donné 11° 7 d'alcool dans un moût de densité 1 128.

Synonymes : *Saccharomycodes ludwigii* HANSEN Var. *vini* KROEMER et HEINRICH.

— *Saccharomycodes mestris* MARCILLA et FEDUCHY.

Synonymes :

Saccharomyces acidifaciens (NICKERSON) Nov. Comb.

Schizosaccharomyces LINDNER

Cellules cylindriques rectangulaires, ovales ou rondes.

Reproduction végétative par scissiparité. Un vrai mycelium qui se démantelle en arthrospores peut être formé.

Les cellules végétatives sont haploïdes.

La formation des asques est en règle générale précédée par une conjugaison isogamique. Les spores sont rondes ovales ou reniformes, elles donnent une réaction positive au test à l'iode pour la présence d'amidon.

4 à 8 spores par asque.

Catabolisme fermentatif. Pas d'assimilation du nitrate.

Pas de croissance avec l'éthanol comme seule source de carbonne.

— *Schizosaccharomyces liquefaciens* Osterwalder.

Synonymes : *Schizosaccharomyces pombe* LINDNER.

— *Schizosaccharomyces moscovia*,
description insuffisante. Ce nom est à rejeter.

— *Schizosaccharomyces octosporus* BEIJERINCK.

D'après SCHANDERL, cette espèce ne joue qu'un rôle secondaire en Oenologie car elle ne résiste pas à la concurrence des *Saccharomyces* et notamment de *Saccharomyces ellipsoïdeus*. Elle a été trouvée par Osterwalder dans un moût de raisin sulfité.

— *Schizosaccharomyces pombe* LINDNER.

Cette espèce que l'on ne trouve que très rarement à l'état spontané dans

les vins et moûts en fermentation, pourrait être utilisable dans la production des mousseux, d'après SCHANDERL (7). Elle se trouve surtout dans les milieux très sucrés (miel-mélasse de canne à sucre etc...).

Synonymes : *Schizosaccharomyces liquefaciens* Osterwalder.

Torula Turpin

Ce genre a disparu de la classification des levures. Le nom de *Torula* est réservé à des champignons très différents.

— *Torula nigra*,

description insuffisante ; ce nom est à rejeter.

Torulaspora LINDNER

Ce genre a disparu de la classification.

— *Torulaspora fermentati* SAITO.

Synonymes : *Saccharomyces fermentati* (SAITO) Nov. Comb.

— *Torulaspora rosei* GUILLIERMOND.

Synonymes : *Saccharomyces rosei* (GUILLIERMOND) Nov. Comb.

Torulopsis Berlese

Cellules rondes ou ovales, ou très rarement légèrement allongées. Reproduction par bourgeonnement multilatéral.

Cellules exceptionnellement encapsulées, mais pas de production d'amidon.

Pas de pseudomycelium ou simplement un très primitif. En milieu liquide, il y a un dépôt et un anneau, rarement un voile. S'il est présent, le voile n'est jamais du type sec, lourd et boursouflé. En général, pouvoir fermentatif présent, rarement absent. Pas de pigments carotenoïdes.

Le genre *Torulopsis* comprend 22 espèces. Un tout petit nombre de celles-ci, se trouvent dans le vin.

— *Torulopsis acris* Var. *granulosa* MARCILLA et FEDUCHY.

Synonymes : *Cryptococcus albidus* (SAITO) SKINNER.

— *Torulopsis albida* (SAITO) LODDER.

Synonymes : *Cryptococcus albidus* (SAITO) SKINNER.

— *Torulopsis bacillaris* (KROEMER et KRUMBHOLZ) LODDER.

Cette espèce peut former jusqu'à 8° d'alcool, mais la fermentation est très lente. Elle a été trouvée notamment par KROEMER (23), par VERONA et FLORENZANO (24) et par CAPRIOTTI et CANTARELLI (9).

Synonymes :

Saccharomyces bacillaris KROEMER et KRUMBHOLZ.

Cryptococcus bacillaris (KROEMER et KRUMBHOLZ) SKINNER.
Brettanomyces italicus VERONA et FLORENZANO.

— *Torulopsis californicus*.

Description insuffisante. Ce nom est à rejeter.

— *Torulopsis famata* (HARRISON) Nov. Comb.

D'après PEYNAUD, (11), cette espèce ne peut donner plus de 3° d'alcool.

— *Torulopsis pulcherrima* (LINDNER) SACCARDO.

Synonymes :
Torulopsis pulcherrima (LINDNER) SACCARDO Var. *rubra* CASTELLI.

Candida pulcherrima (LINDNER) Windisch.

Trichosporon Behrend

Développement abondant de pseudomycelium et de vrai mycelium, avec des blastospores et arthrospores. Les blastospores se forment d'une façon simple en petites chaines ou en amoncellements. Le degré de développement des blastospores et arthrospores peut être très différent. Cellules de formes variables. Des chlamydospores peuvent se produire. Sur l'extrait de malt, il se forme dépôt anneau et voile.

Catabolisme oxydatif et parfois aussi fermentatif.

— *Trichosporon pullulans* (LINDNER) DIDDENS et LODDER.

Cette espèce se trouve parfois sur les raisins et notamment sur les grains eudémisés ou pourris (observation personnelle).

Synonymes : *Endomyces vernalis* LUDWIG.

Willia HANSEN

Ce genre a pris le nom de : *Hansenula* H. et P. SYDOW.

— *Willia anomala* HANSEN.

Synonymes : *Hansenula anomala* (HANSEN) H. et P. SYDOW.

— *Willia saturnus* (KLÖCKER) HANSEN.

Synonymes : *Hansenula saturnus* (KLÖCKER) H. et P. SYDOW.

Zypopichia KLÖCKER

Sous genre de *Pichia*, supprimé par LODDER et KREGER VAN RIJ.

— *Zygopichia chiantigiana* CASTELLI.

Synonymes : *Pichia membranaefaciens* HANSEN.

Zygosaccharomyces BARKER

Sous genre de *Saccharomyces supprimé par* LODDER et KREGER VAN RIJ.

— *Zygosaccharomyces bailii* (LINDNER) GUILLIERMOND.

Synonymes : *Saccharomyces rouxii* Boutroux Var. *polymorphus* (KROEMER et KRUMBHOLZ) Nov. Var.

— *Zygosaccharomyces barkeri Saccardo et Sydow*

Synonymes : Saccharomyces rouxii Boutroux Var. *polymorphus*. (KROEMER et KRUMBHOLZ) Nov. Var.

— *Zygosaccharomyces felsineus Sacchetti.*

Synonymes : Saccharomyces rouxii Boutroux Var. *polymorphus*. KROEMER et KRUMBHOLZ) Nov. Var.

— *Zygosaccharomyces florentinus* CASTELLI.

Synonymes : *Saccharomyces florentinus* (CASTELLI) Nov. Comb.

— *Zygosaccharomyces globiformis* KROEMER et KRUMBHOLZ.

Synonymes : *Saccharomyces rosei* (GUILLIERMOND) Nov. Comb.

— *Zygosaccharomyces gracilis* KARAMBOLOFF et KRUMBHOLZ.

Synonymes : *Saccharomyces rouxii* Boutroux.

— *Zygosaccharomyces polymorphus* KROEMER et KRUMBHOLZ.

Synonymes : *Saccharomyces rouxii* Boutroux Varr. *polymorphus*. (KROEMER et KRUMBOLHZ) Nov. Var.

— *Zygosaccharomyces variabilis* KROEMER et KRUMBHOLZ.

Synonymes : *Saccharomyces rouxii* Boutroux.

— *Zygosaccharomyces vini* NAHANISHI.

Synonymes : *Saccharomyces rouxii* Boutroux.

BIBLIOGRAPHIE

(1) FLORENZANO (G.). — Diffusione et significato enologico dei lieviti Brettanomyces. *Academia Italiana delle vite e del vino*. Siena. Atti, Vol III, p. 236, 1951.
(2) MRAK (E. M.) et MAC CLUNG (L. S.). — Yeasts occuring on grapes and grape products in California. *Journ. of Bacteriology*, Vol. 40, p. 395.

(3) Castelli (T.). — I lieviti della fermentazione vinaria nel Piceno. *Annali facolta agraria Perugia*, Vol. IV, 1947.
(4) Capriotti (A.). — Gli agenti della fermentazione vinaria nella venezia Tridentina. *Atti dell'Academia Italiana della vite e del vino*, Vol. V, 1953.
(5) Malan (C. E.). — I lieviti della fermentazione vinaria in Piemonte. *Academia Italiana della vite e del vino*. Siena. Atti. Vol. V, p. 477, 1953.
(6) Scheffer (R.) et Mrak (E. M.). — Characteristics of yeast causing clouding of dry white wines. *Mycopathologia mycologia applicata*, 1951, **5**, 236.
(7) Schanderl. — Die Mikrobiologie des weines. Verlages-Buch-Handlung Eugen Ulmer, Stuttgart, 1950.
(8) Tommaso Castelli. — Aspetto biologico della fermentazione vinaria nelle zone calde. *Atti dell'Academia Italiana vite e del vino*, Vol. IV, 1952.
(9) Capriotti et Cantarelli. — Gli agenti della fermentazione vinaria della provincia di treviso. *Rivista di Viticultura e di Enologia di Conegliano*. N° 6-7-8, 1952.
(10) Verona (O.). — Aspetti e problemi relativi agli agenti della fermentazione vinaria. *Academia Italiana della vite e del vino*, Siena. Atti., Vol. V, 1951, p. 203.
(11) Peynaud (E.) et Mlle Domercq (S.). — Étude des levures de la Gironde. *Ann. Techn. Agr.* de l'I. N. R. A., Tome 2, n° 4, p. 265-300, 1953.
(12) Marcilla (J.) et Feduchy . — Contribution al estudio de una levadura perteneciente al genero « Saccharomycodes » capaz de fermentar mostos de uva fuertemente sulfitados (mostos azufrados), sin previa desulfitacion. *Centros de estudios generales y de ampelografia y viticultura*, n° 29, sept. 1943.
(13) Tommaso Castelli. — Ricerche Microbiologiche sulle uve di moscate di Pantalleria. *Rivista di viticoltura e di enologia di Conegliano*, n° 3, mars 1954.
(14) Giudice (E. del). — Gli agenti della fermentazione vinaria della sicilia occidentale. *Centro regionale sperimentale per l'industria enologica*, Marsala.
(15) Marcilla, Alas et Feduchy. — Contribution al estudio de las levaduras que forman velo sobre ciertos vinos de elevado grado alcoholico. *An. Del Centro. Investig. Vinicolas*, 1, 1, 230, 1936.
(16) Fornachon (J. C. M.). — Studies on the sherry Flor. *Australian wine board.*, 1953.
(17) Renaud (J.). — Les levures des vins du val de Loire. Librairie générale de l'enseignement.
(18) Cantarelli (C.). — Sull'associazione Scalare dei lieviti Selezionati nella vinificazione. *Revista di Viticoltura e di Enologia di Conegliano*, n° 3, mars 1953.
(19) Kroemer and Krumbholz. — Untersuchungen über osmophile sproszpilze, I, V, *Arch. f. Mikrobiol.* Bd 2. u. 3, 1931-32.
(20) Sacchetti (Mario). — Richerche salla fermentazione di un mosto d'uva concentrato. *Archiv. f. Midrobiol.*, Bd. 3, p. 473-491, 1932.
(21) Castelli (T.). — *Arch. Mikrobiol*, Vol. 12, p. 260, 1942.
(22) Kroemer (K.). — Uber eine in überschwefelten Mosten auftretende Hefe der gattung Saccharomycodes. Festschrift zum 50 Jährigen Jubiläum 1922.
(23) Kroemer (K.) et Krumbholz (G.). — *Arch. Mikrobiol.*, Vol. 2, p. 352, 1931.
(24) Verona (O.) et Florenzano (O.). — Alcune considerazione sopra lieviti filamentosi presenti nelle uve e nei vini. *L'agricoltura italiana*, Vol. 47, p. 113, 1947.
(25) Bobadilla (G. F. de) .— Aplicaciones industriales de las levaduras de flor. Agriculture. *Revista Agropecuaria*, **12**, 203, 1943.

(26) DUPUY (P.). — Action oxydante du micoderma vini sur certains composés du vin. *Ann. Techn. Agr.* de l'I. N. R. A., Tome I, nº 1, p. 125-132. 1952.
(27) CAPRIOTTI (A.). — Gli agenti della fermentazione vinaria nella calabria. *Annali della facolta di Agraria dell'universita di Perugia,* Vol. VIII.
(28) FLORENZANO (G.). — La correzione dell'acidia volatile nei vini per via biologica. *Academia Italiana della vite e del vino,* Siena. Atti, Vol. III, p. 215, 1951.
(29) MENSIO (C.). — Fermentazione di moste fortemente solfutari. Di un nuevo fermento in enologia appartemente al genere Saccharomycodes. *Le Staz. Sperim. Agrar. Ital.* Bd. 44, A. 829-842, 1911.
(30) CUSTERS (M. T. J.). — Onderzoekingen over het gistgeslacht Brettanomyces. *Thesis. Tech. Hoogeschool,* Delft, 1940.
(31) KRUMBHOLZ and TAUSCHANOFF. — Mycotorula intermedia n. sp. ein Beitrag zur Kenntnis der Gärungserreger in Wein. *Cbl. Bakter. usw.* Abt II, Bd 88, S. 366-373, 1933.
(32) DVORNIK (R.). — Uber die sporulation der apiculatushefen. *Cbl. Bakter usw.*, Abt. II, Bd 98, S. 315-344, 1938.
(33) BIDAN (P.) et ANDRÉ (L.). — Études sur les levures à voile des vins jaunes du Jura. Xe Congrès International de Madrid. 1954.
(34) JONE ROSSI. — Contributo alla conoscenza della Floculazione nei lieviti vinari. *Annali della Facolta di Agraria dell'universita di Perugia,* Vol. IX.
(35) DESCOFFRE (A.). — Étude sur les levures œnogènes des Charentes. *Thèse Pharmacie,* Bordeaux, 1904.
(36) VENTRE (J.). — Les levures en vinification. *Revue de viticulture,* 1934, 80, 181.
(37) ROSSI (G. de). — I lieviti della fermentazione vinaria nella regione umbra. IVe Congrès International de la Vigne et du Vin. Lausanne, 1935.
(38) CANTARELLI (T.). — I lieviti della fermentazione vinaria nei Castelli romani. *Ann. Facolta di agraria* (Pérouse), 1942, I.
(39) SENSI (A.). — I lieviti della fermentazione vinaria nell'Orvietano. Thèse, Pérouse, 1942.
(40) CASTELLI (T.). — Indagini microbiologiche sui mosti dell'Orvietano. *Rivista viticolt. enol.*, Conegliano, 1948, nº 6.
(41) BECCI (M.). — Indagini sugli agenti della fermentazione vinaria nella provincia di Ancona. Thèse, Pérouse, 1948-49.
(42) CASTELLI (T.). — Arcora sui lieviti della fermentazione vinaria nel chianti classico nuovi annali del'Agricoltura, XIX, 1939.

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 15-9-1956.

Dépôt légal : 3e trimestre 1956 *N° d'impression : 303*

L'ÉBULLITION DOMESTIQUE DU LAIT. SON ACTION SUR LA FLORE MICROBIENNE ET LES CONSTITUANTS DU LAIT

PAR

M. PLOMMET

Station centrale de Microbiologie et Recherches laitières
Jouy-en-Josas

PLAN DU MÉMOIRE

Introduction.

PREMIÈRE PARTIE

Enquête sur l'utilisation domestique du lait.

A. — Conditions de l'enquête.
B. — Résultats.
C. — Discussion.

DEUXIÈME PARTIE

Composition du lait bouilli.

A. — Matériel et méthodes d'analyse.
B. — Résultats.
C. — Discussion.

TROISIÈME PARTIE

Flore microbienne du lait bouilli et son évolution au cours de la conservation.

A. — Observations préliminaires.
B. — Population microbienne du lait après ébullition et après incubation à différentes températures.
1° Matériel et méthode.
2° Résultats et discussion.
C. — Altérations du lait bouilli et conservé à 24°.
D. — Nature des germes résistants à l'ébullition.
1° Méthode.
2° Résultats et discussion.

E. — Vitesse de développement des sporules dans le lait bouilli.

1° Méthodes.
2° Résultats.
3° Discussion.

Conclusion.

INTRODUCTION

En France, c'est un fait bien connu, la ménagère fait bouillir son lait. A cela deux raisons : la première, d'ordre pratique, est que très souvent le lait pasteurisé du commerce ne se conserve pas dans les conditions de température où on le place habituellement ; la seconde, plus théorique, est le doute manifesté par de nombreuses personnes quant à l'efficacité de la pasteurisation en tant que mesure d'hygiène destinée à détruire les microbes pathogènes du lait.

Dans les pays les plus évolués en matière d'hygiène du lait, le lait est soit livré pasteurisé et consommé sous cette forme (U. S. A., pays anglo-saxons et scandinaves), soit livré cru et bouilli à domicile (Suisse). Les conditions géographiques particulières de la Suisse — agglomérations urbaines relativement peu étendues et situées à proximité des lieux de production — ainsi que l'habitude qu'ont les Suisses de ne consommer le lait qu'à l'état de café au lait chaud rendent cette dernière méthode de distribution et d'assainissement logique. En France, il serait à peu près impossible de distribuer le lait cru dans les grandes agglomérations en raison de l'étendue des bassins laitiers qui ne sont d'ailleurs pas toujours situés à proximité des villes à desservir (cas du Midi de la France). On a donc recours à la pasteurisation et lorsque le lait est bouilli à domicile il a déjà été pasteurisé une ou deux fois.

Les travaux consacrés à la pasteurisation sont maintenant innombrables et la méthode est parfaitement connue, tant dans ses conditions d'application que dans ses résultats (1), (5), (20). Par contre l'ébullition domestique du lait, bien qu'officiellement recommandée en France, est en fait mal connue et la bibliographie des travaux la concernant est très réduite. Il faut remonter à Gay-Lussac qui donne une consécration scientifique à l'ébullition ménagère en montrant qu'on peut conserver le lait indéfiniment à la condition de le faire bouillir tous les deux jours (2). Pasteur a démontré de son côté « que des vibrions peuvent naître dans un liquide de la nature du lait qui a subi une ébullition de plusieurs minutes à la température de 100°... (mais) si l'on pratique l'ébullition à 110° ou 112° sous une pression d'une atmosphère et demie, jamais le lait ne donnera d'infusoires » (3). Soxhlet, en 1887, invente un appareil pour la stérilisation du lait en flacons par immersion de ceux-ci dans l'eau bouillante. En

1916, J. RENAULT et P. P. LÉVY (4), désireux d'améliorer le procédé de SOXHLET dans son application à l'alimentation des nourrissons, publient une étude sur l'ébullition du lait et concluent :

— « la cuisson de trois quarts d'heure recommandée par SOXHLET n'a aucun avantage sur une cuisson plus courte (moins d'une minute) en ce qui concerne le *Bacillus subtilis* et autres saprophytes. L'une et l'autre tuent les bactéries et empêchent la coagulation subtilienne pendant les 24 heures qui suivent le chauffage ; ni l'une ni l'autre ne détruisent les spores qui se transforment en bactéries les jours suivants. »

Ils ajoutent que pour détruire les pathogènes, il suffit que l'eau du bain-marie atteigne 94° à 96°, qu'une ébullition prolongée n'a donc pas d'utilité, que les biberons doivent être refroidis et mis au frais et qu'ils doivent être consommés dans les 24 heures.

Si nous savons bien que l'ébullition domestique est la règle générale dans les foyers français, nous ignorons les conditions habituelles de cette ébullition, spécialement en ce qui concerne le lait lui-même : son origine, le traitement qu'il a pu subir, les modalités de son chauffage, de sa conservation et de son utilisation. Avant d'étudier l'ébullition, il nous a semblé qu'il fallait savoir comment, dans la pratique, la ménagère fait bouillir son lait. En effet, les opinions des hygiénistes et les recommandations qu'ils donnent sur l'ébullition du lait sont assez différentes les unes des autres notamment en ce qui regarde la durée de maintien à l'ébullition et l'on peut se demander comment ces recommandations sont appliquées, en fait, dans la pratique ménagère. La première partie de notre travail a donc été consacrée à une enquête, effectuée au début de l'année 1955 auprès de 128 personnes représentant 128 foyers français différents pour connaître leur manière de traiter et d'utiliser le lait à la maison.

Pendant le chauffage et le refroidissement une « peau » mince et plissée apparaît à la surface du lait et va en s'épaississant. En même temps il se forme sur les parois chaudes de la casserole un « gratin » d'autant plus épais que l'ébullition est plus prolongée et que le lait est plus acide. Les constituants de la peau et du gratin sont ou bien perdus complètement (cas du « gratin ») ou bien utilisés incomplètement (cas de la « peau »). Dans une deuxième partie nous avons cherché à estimer la perte qui en résulte en étudiant les quantités de matière sèche totale, de matière grasse et de protéines contenues d'une part dans le lait avant l'ébullition, d'autre part dans le lait, la peau et le gratin immédiatement après l'ébullition et après 24 heures de repos.

Enfin, puisque l'ébullition est surtout un procédé de destruction des microbes et de conservation du lait, nous avons, dans une troisième par-

tie, étudié les germes résistant à l'ébullition et leur action sur le lait au cours de sa conservation. Notre étude n'a pas porté sur les germes pathogènes non sporulés le plus souvent rencontrés dans le lait (Bacille tuberculeux, Brucelle). On sait qu'une pasteurisation efficace (72° pendant 15 secondes, par exemple) les détruit. Un chauffage à 100° détruit à fortiori tous ces germes pathogènes. Si certains d'entre eux étaient encore vivants dans le lait soumis à l'ébullition domestique cela ne pourrait être dû qu'à un chauffage incomplet d'une certaine fraction du liquide.

PREMIÈRE PARTIE :
ENQUÊTE SUR L'UTILISATION DOMESTIQUE DU LAIT

A. — Conditions de l'enquête.

Le questionnaire, reproduit dans le tableau I, a été distribué au cours du premier trimestre 1955 à environ 300 personnes. 128 réponses nous sont parvenues des départements suivants : Seine et Seine-et-Oise (Paris et banlieue) 97 réponses ; autres départements (Cher, Eure, Haute-Savoie, Isère, Loir-et-Cher, Loiret, Meurthe-et-Moselle, Nord, Seine-et-Marne, Seine-Maritime, Puy-de-Dôme, Yonne) 31 réponses.

Tableau I

QUESTIONNAIRE

Nom..... Commune.....

Indiquez quelles sont vos habitudes. Répondez par OUI ou NON.

1° Quel type de lait achetez-vous ?
— pasteurisé, en bouteille.....
— pasteurisé, en bidon .....
— cru .....

2° En achetez-vous tous les jours ? .....

3° Est-il consommé dans les 24 heures ? ....., Sinon, en combien de temps ? .....

4° Le faites-vous bouillir ? ..... Si vous répondez non, ne regardez pas les questions 4, 5, 6, 7.

Si oui, — combien de temps après l'achat : ..... heures
— combien de temps le faites-vous bouillir ? — jusqu'à ce qu'il monte ? .....
— .....minutes ?

5° Vous arrive-t-il de le faire bouillir plusieurs fois ? .....
— pour le conserver plus longtemps ? .....
— dans un autre but (indiquez-le) ? .....

6° Utilisez-vous ce lait bouilli encore chaud ? en totalité .....
en partie.....
uniquement après refroidissement.....

Si vous ne l'utilisez pas immédiatement après l'ébullition, le faites-vous refroidir (en mettant la casserole dans l'eau, par exemple) et le conservez-vous au frais (cave, réfrigérateur) ? ....
ou bien le laissez-vous dans un coin de la cuisine refroidir seul ? .....

7° Laissez-vous la peau dans ce lait, pour qu'elle soit absorbée en boisson (café au lait, chocolat) ? .....
Ou bien la récoltez-vous à part pour la cuisine ? .....
Ou la recueillez-vous dans la passoire pour la jeter ou la donner aux animaux ? .....

8° Consommez-vous du lait "nature" ? (c'est-à-dire sans café, chocolat) .....:
chaud ..... sucré .....
refroidi..... non sucré.....

9° Etes-vous satisfait du lait que vous pouvez vous procurer ? .....
Si non, pourquoi ne l'êtes-vous pas ? Mauvais goût .....
Mauvaise conservation.....
Pas assez crémeux .....

B. — **Résultats.**

Ils sont indiqués dans les tableaux II et III.

Tableau II

Type de lait acheté d'après les réponses au questionnaire.
Répartition entre Paris et la province,

Type de lait	Paris	Province	Total
Pasteurisé conditionné	52	8	60
Pasteurisé ; livré en bidons	15	2	17
« Cru »	28	21	49
« Stérilisé » concentré ou en poudre....	2		2
Total.....	97	31	128

C. — **Discussion.**

On constate (tableau II), que la majorité des consommateurs de Paris utilisent le lait pasteurisé conditionné. Ce n'est pas sans surprise, par contre, que l'on apprend que 28 réponses de personnes interrogées à Paris font mention de l'achat de lait « cru » : la vente de lait cru ne représente que 1 p. 100 environ du lait vendu dans le département de la Seine. Cette confusion entre le lait cru et le lait pasteurisé livré en bidons prouve l'ignorance de la ménagère en ce qui concerne les qualités et l'origine du produit qu'elle achète.

Cependant le lait est un aliment de tous les jours ; presque toutes les ménagères en achètent quotidiennement et le consomment dans la journée. Un petit nombre, bien qu'achetant du lait tous les jours, ne le consomme pas toujours dans les 24 heures. On ne constate pas de corrélation entre le type de lait acheté et la fréquence d'achat ou la durée d'utilisation.

Les réponses données à la quatrième question (tableau I) confirment l'opinion que la grande majorité des consommateurs font bouillir leur lait. Toutefois, cette pratique n'est pas une règle absolue surtout parmi les acheteurs de lait conditionné.

Tableau III

Utilisation domestique du lait

	Pour cent des réponses en faveur de la question posée
Fréquence d'achat et durée d'utilisation :	
achat quotidien	83
consommation en 24 h	80
achat quotidien et consommation en 24 h	75
Conditions de l'ébullition :	
ébullition à domicile	86
pas d'ébullition à domicile	14*
Moment auquel a lieu l'ébullition :	
ébullition aussitôt après l'achat	12
avant la troisième heure qui suit l'achat	58
au moment de l'emploi	5
pas de réponse	25
Durée de l'ébullition :	
jusqu'à montée du lait	43
moins de trois minutes	12
de 3 à 5 minutes	16
5 minutes	16
10 minutes et plus	9
pas de réponse	4
Répétition des ébullitions :	
une seule ébullition	54
parfois plusieurs ébullitions	40
pas de réponse	6
Mode de refroidissement du lait après l'ébullition :	
pas de refroidissement autre que le refroidissement spontané	37
refroidissement provoqué	42
consommation immédiate du lait	13
pas de réponse	8
Utilisation de la « peau » du lait :	
consommée	60
prélevée et jetée	9
prélevée et destinée à la cuisine	30
Consommation du lait en nature (sans adjonction d'aucune sorte) :	
consomment quelquefois	44**
Appréciation d'ensemble portée sur le lait du commerce :	
satisfaction	83
formulent des critiques	12
pas de réponses	5

* Parmi les 14 p. 100 :
10 achètent du lait conditionné
3 — du lait en bidons
1 — autre lait

** Parmi les 44 pour cent 37 consomment leur lait après ébullition
7 — sans ébullition préalable.

L'ébullition est en général faite dans les heures qui suivent l'achat comme si cette opération ne souffrait aucun retard ; cependant quelques personnes négligentes répondent « quand j'y pense, quand j'ai le temps... » D'autres, disposant en général d'un réfrigérateur, attendent le moment de l'emploi pour faire bouillir le lait. Ce procédé, dont nous discuterons plus loin l'intérêt au point de vue bactériologique, n'est donc adopté que par une minorité de consommateurs.

Il n'y a guère de règles précises concernant la durée de l'ébullition qui est, en fait, fantaisiste. Peut-être la formule « jusqu'à ce que le lait se sauve » aurait-elle groupé une large majorité ? On note des ébullitions de 15 minutes, d'ailleurs justifiées par des remarques de ce genre : « pour des raisons d'asepsie... », « sur recommandation médicale... »

Les méthodes de refroidissement employées ne sont pas toujours

d'une bien grande efficacité, mais nous en avons cependant toujours tenu compte dans les statistiques comme traduisant au moins une intention. Il faut remarquer que le peu de soins apportés au refroidissement après l'ébullition n'est sans doute pas sans rapport avec l'obligation qu'ont de nombreuses ménagères de faire bouillir de nouveau le lait pour le conserver.

La « peau » est prélevée avant la consommation dans 39 p. 100 des cas : c'est-à-dire que 39 p. 100 des consommateurs absorbent un lait partiellement écrémé. Un petit nombre (9. p 100) perdent entièrement la matière grasse de la « peau » qu'ils jettent. Il est intéressant de rapprocher ces chiffres du fait que la valeur marchande de la matière grasse représente environ les trois quarts de celle du lait, et que le lait écrémé est une boisson à laquelle on n'accorde en France que peu d'estime.

Le lait en « nature » est un lait qui n'a pas subi d'adjonction autre que celle du sucre. On peut être surpris de la proportion élevée de personnes qui disent consommer du lait sous cette forme, d'autant plus qu'il s'agit 37 fois sur 44 du lait bouilli, c'est-à-dire d'un lait dont la saveur (goût de cuit) n'est pas particulièrement agréable. Ces personnes se répartissent également parmi les acheteurs de lait conditionné et les acheteurs de lait en bidons.

L'appréciation d'ensemble portée par le consommateur sur la qualité du lait qu'il achète est flatteuse mais surprenante, étant donnée la forte proportion de lait consommé après ébullition et la durée de conservation insuffisante que l'on reproche souvent au lait vendu dans le commerce. Il semble que cette appréciation doive être interprétée plutôt comme traduisant un état d'indifférence et une méconnaissance des qualités que possède un bon lait de consommation plutôt qu'une réelle satisfaction.

Il pourrait éventuellement être intéressant d'étendre davantage cette enquête en étudiant la répartition des réponses selon les milieux sociaux.

Les résultats que nous avons obtenus permettent de schématiser ainsi le comportement de la ménagère française : elle achète du lait de plusieurs types, mais n'a pas d'idées bien précises sur ce que représente chacun de ces types. Ils sont caractérisés surtout à ses yeux par la nature du récipient dans lequel le lait est vendu (lait en bouteilles, lait en bidons, etc...).

De toute manière la ménagère fait bouillir son lait (dans 86 p. 100 des cas) mais ne sait pas comment le faire bouillir ni comment le conserver, sinon en le faisant bouillir de nouveau.

Quelques-unes seulement (5 p. 100) le conservent au froid et ne le font bouillir qu'au moment de l'emploi. Parmi les acheteurs de lait pasteurisé vendu en bouteilles, 22 p. 100 ne le font pas bouillir.

Très généralement, les consommateurs français sont satisfaits du lait qu'ils se procurent mais ignorent la plupart du temps ce qu'est un bon lait : 7 p. 100 seulement le consomment en nature (c'est-à-dire sans café ni chocolat) non bouilli.

DEUXIÈME PARTIE : COMPOSITION DU LAIT BOUILLI

A. — Matériel et méthodes d'analyse.

Le lait utilisé est du lait pasteurisé vendu dans le commerce. Un litre de ce lait est versé dans une casserole d'aluminium (diamètre 140 mm, hauteur 140 mm, épaisseur de la tôle 2 mm) et chauffé sur un réchaud à gaz jusqu'au moment de la montée du lait. On le laisse ensuite refroidir spontanément à l'air libre.

La « peau » est prélevée soit après 30 minutes, soit après 24 heures à l'aide d'une écumoire de ménage, en prenant soin de ne pas laisser de peau adhérente à la casserole et en égouttant rapidement. Elle est pesée puis homogénéisée par agitation vigoureuse dans un flacon contenant des billes de verre.

Le lait bouilli débarrassé de la « peau » et du « gratin », est pesé puis transvasé.

Le « gratin » est pesé (par différence avec le poids de la casserole vide) puis râclé avec une spatule et homogénéisé de la même manière que la peau.

La détermination de la substance sèche est faite par dessiccation à l'étuve à 100° de 10 g environ de lait, et de 1 g environ de « peau » ou de « gratin ».

La teneur en matière grasse est déterminée par la méthode Röse-Gottlieb, sur des échantillons de 10 g environ de lait, et 1 g environ de « peau » ou de « gratin ».

La teneur en protéines est déterminée par dosage de l'azote total au Kjeldahl sur des échantillons d'environ 1 g de lait et 0,1 à 0,2 g de « peau » ou de « gratin ».

B. — Résultats.

1° Dans les conditions qui viennent d'être décrites, la perte de poids résultant de l'évaporation au cours de l'ébullition et des 30 minutes de refroidissement est d'environ 50 g par litre de lait. Après 24 heures de refroidissement et de conservation, elle est voisine de 80 g par litre de lait.

2° 30 minutes après l'ébullition le poids de la « peau » est en moyenne de 10 g. Après 24 heures il est de 58 g.

3° Le poids de « gratin » varie de 16 à 17,5 g.

4° Nous avons représenté dans le tableau IV les quantités de matière sèche (S), de matière grasse (G) et de protéines (P) se trouvant respective-

ment d'une part dans le lait avant l'ébullition (ramené à 100), d'autre part dans le lait après l'ébullition, dans la « peau » et dans le « gratin ». Nous avons calculé les rapports $\frac{G}{S}$ et $\frac{G + P}{S}$ donnant les proportions de matière grasse et de protéines dans la matière sèche des différents produits examinés.

TABLEAU IV

Répartition, en pour cent, des constituants du lait cru ou pasteurisé entre les différentes fractions d'une casserole de lait bouilli

	Avant l'ébullition	Après l'ébullition			
	Lait cru ou pasteurisé	Lait bouilli	« Peau »	« Gratin »	Temps écoulé entre l'ébullition et le prélèvement
S	100	93 75,7	4 21	3 3,3	30 minutes 24 heures
G	100	87 34	9 61	4 5	30 minutes 24 heures
P	100	93 90	3 5	4 5	30 minutes 24 heures
$\frac{G}{S}$	0,30	0,26 0,12	0,61 0,78	0,38	30 minutes 24 heures
$\frac{G + P}{S}$	0,58	0,51 0,44	0,81 0,87	0,76	30 minutes 24 heures

S : matière sèche G : matière grasse P : protéines

C. — Discussion.

La proportion de matière grasse du lait qui passe dans la peau varie dans de larges limites suivant le temps écoulé entre l'ébullition et le prélèvement : au bout de 30 minutes, elle est déjà de 9 p. 100 et atteint 61 p. 100 au bout de 24 heures. Il en résulte que les personnes qui retirent la peau du lait longtemps après l'avoir fait bouillir consomment, en fait, un lait écrémé. La proportion de matière grasse contenue dans le « gratin » ne varie pas beaucoup pendant la conservation, mais elle n'est jamais négligeable. Au total 66 p. 100 des matières grasses peuvent être perdues dans certaines conditions de conservation et d'utilisation du lait (9 p. 100 des consommateurs jettent la peau) à la suite de l'ébullition domestique.

Les proportions de matière sèche et de protéines contenues dans la peau et le gratin sont moins importantes, mais représentent cependant

7 p. 100 de la matière sèche et des protéines totales 30 minutes après l'ébullition et atteignent respectivement 24 p. 100 et 10 p. 100 si le lait est laissé au repos pendant 24 heures après l'ébullition.

Pour un poids déterminé de lait cru ou pasteurisé mis en œuvre, la quantité totale d'éléments nutritifs retrouvés dans le poids de lait bouilli obtenu est sensiblement réduite par rapport à celle existant dans le lait initial. Le tableau IV montre en outre que les rapports $\frac{\text{matière grasse}}{\text{matière sèche}}$ et $\frac{\text{matière grasse} + \text{protéines}}{\text{matière sèche}}$ sont plus petits dans le lait bouilli que dans le lait cru et qu'ils sont au contraire plus élevés dans la « peau » et dans le « gratin ».

Les techniques domestiques ne permettent guère d'éviter la formation de gratin. Pour réduire la formation de la peau, il faut chauffer le lait juste avant l'emploi et ne pas prolonger inutilement l'ébullition. On économise par ce procédé un deuxième chauffage au moment de la consommation.

L'ébullition est donc une technique onéreuse ; de plus il est impossible de chiffrer les pertes dues aux débordements qui se produisent au moment de la montée du lait. Enfin, les calories nécessaires au chauffage, le temps passé au nettoyage de la casserole élèvent encore le prix réel de l'ébullition.

TROISIÈME PARTIE : FLORE MICROBIENNE DU LAIT BOUILLI ET SON ÉVOLUTION AU COURS DE LA CONSERVATION

A. — Observations préliminaires.

Si l'on chauffe du lait dans une casserole du type déjà décrit et si l'on observe la température indiquée par un thermomètre plongé au centre du liquide, on constate qu'il se forme un léger anneau de mousse le long des parois chaudes de la casserole quand la température atteint 80°. Cette mousse s'épaissit d'abord lentement, puis plus vite : à 90° elle couvre la surface du lait, à 95° elle s'épaissit rapidement, à 97° le lait commence à monter et il se « sauve » à 99° (1) (2).

Le phénomène ainsi décrit est d'apparence banale. Cependant l'expérience montre que de nombreuses personnes ont sur ce sujet des idées erronées : la plupart des traités d'hygiène, les manuels de puériculture et les articles de revues spécialisées indiquent souvent que le lait « monte », « se sauve », ou même « bout » à 80°, 85° ou 90°, et qu'en conséquence il faut prolonger l'ébullition pour assurer la destruction des germes pathogènes.

(1) La différence entre les températures indiquées par des thermomètres plongés dans les différentes parties de la masse du liquide (au fond, au bord, à la surface) n'excède pas 1°.

(2) Ces résultats sont obtenus sous une pression atmosphérique normale de 760 mm. de mercure. Rappelons que pour des températures atmosphériques moyennes, l'eau bout à 100° à l'altitude 0, pression 760 mm., à 98°3 à 500 m, pression 715 mm., à 96°6 à 1000 m, pression 672 mm.

Puisque la mousse apparaît seulement lorsque le lait atteint 80° c'est-à-dire une température à laquelle le bacille tuberculeux est détruit (1), il n'y a aucune utilité à prolonger l'ébullition pour assurer la destruction des pathogènes.

Cependant des germes microbiens sporulés résistent à l'ébullition. Sont-ils capables dans les conditions de la pratique ménagère de se développer dans le lait bouilli et de l'altérer ?

On a vu d'après les résulsats de l'enquête exposés dans la première partie de ce travail que de nombreuses personnes conservent leur lait d'un jour à l'autre, sans toujours prendre des précautions spéciales concernant le refroidissement. Nous avons donc cherché à estimer la population microbienne d'un lait du commerce bouilli, puis du même lait conservé aux températures usuelles des habitations.

B. — Population microbienne d'un lait après ébullition et après incubation à différentes températures.

1° Matériel et méthode.

Le lait utilisé a été acheté chez 12 commerçants différents, cru ou pasteurisé, livré en bidons ou en bouteilles.

Pour dénombrer les spores immédiatement après l'ébullition, deux techniques, différant seulement par les modalités du chauffage, ont été concurremment utilisées sur les premiers échantillons examinés. Dans l'une le lait est pipetté directement dans la casserole, après chauffage jusqu'à la température de montée du lait (97-99°), puis il est introduit dans 4 boîtes de Pétri (1 cm^3 par boîte) et le milieu gélosé est aussitôt coulé sur le lait (2). L'autre technique est une adaptation de celle décrite par RIDGWAY (6) : 10 cm^3 de lait sont introduits dans deux tubes à essai identiques et les tubes sont plongés dans un bain-marie bouillant. Un thermomètre est placé dans l'un des tubes. On compte 2 minutes après le moment où la température atteint 97°5, puis on plonge les tubes dans l'eau froide. Le lait est alors introduit dans 4 boîtes de Pétri (1 cm^3 par boîte) comme dans la première méthode. Dans les deux techniques les boîtes de Pétri sont incubées 48 h à 30°. Les résultats obtenus sur les premiers échantillons examinés étant sensiblement équivalents, la méthode de RIDGWAY a seule été retenue par la suite, les conditions du chauffage y étant mieux définies.

(1) Le bacille tuberculeux, aux concentrations auxquelles on peut le rencontrer dans le lait, est détruit par un chauffage à 72°, pendant 15 secondes ou par un chauffage à 76° pendant 2 à 4 secondes (1, 5, 20).

(2) Composition du milieu : extrait de viande : 10 ; peptone : 10 ; ClNa : 5 ; agar : 28 ; eau distillée : 1000.

La concentration élevée en gélose, qui rend le milieu « dur », retarde l'envahissement de la surface de la boîte par les colonies de sporulés.

La numération des germes du lait bouilli puis incubé est faite dans les conditions suivantes : le lait est mis à bouillir dans une casserole munie d'un couvercle bien ajusté. On arrête le chauffage au moment de la montée du lait ou seulement après 10 minutes comptées à partir de cette montée.

La casserole de lait est alors refroidie rapidement jusqu'aux environs de la température d'incubation par immersion dans un courant d'eau. Elle est mise ensuite à incuber pendant 24 heures. La numération est faite, après dilution convenable, sur le milieu gélosé en boîtes de Pétri.

Les températures d'incubation choisies sont 15°, 18° et 24°. La température de 24° est celle des habitations en été ; elle est habituellement utilisée pour les épreuves de conservation du lait ; 18° est la température normale des locaux habités ; 15° la température d'un local frais ou d'une cave.

2° **Résultats et discussion.**

a) Nombre de germes dans le lait après ébullition.

Nous avons trouvé, pendant les mois de septembre et octobre (tableau V) 22 spores par cm^3 de lait en moyenne sur 32 échantillons (minimum : moins d'une spore par cm^3 ; maximum : 46 spores par cm^3).

Au mois de janvier, la moyenne de 20 échantillons de lait était de 44 spores par cm^3, avec un minimum de 10 spores et un maximum de 200. Nos résultats concordent avec ceux de RIDGWAY (6) qui constate des variations saisonnières, avec des chiffres de spores de moins de 1 à plus de 500 par cm^3. Il n'y a pratiquement pas de lait exempt de spores ; la pasteurisation et le conditionnement ne modifient pas de façon significative le nombre de spores existant à l'origine dans le lait cru.

b) Nombre de germes dans le lait bouilli après 24 heures d'incubation.

Le tableau V montre qu'il n'y a pratiquement pas de prolifération microbienne dans le lait bouilli conservé à 15°. La prolifération qui est faible à 18° devient très importante à 24° ; le nombre de germes microbiens atteint plusieurs millions en 24 heures. Dans le lait bouilli 10 minutes il y a, en général, moins de germes que dans le lait bouilli pendant un temps plus court. Ce n'est cependant pas toujours le cas : une ébullition prolongée favorise parfois la prolifération microbienne (voir par exemple les échantillons n° 20, 21, 24 du tableau V).

C. — **Altérations du lait bouilli et conservé à 24°.**

Sur un certain nombre d'échantillons étudiés au paragraphe précédent, nous avons effectué l'épreuve de coagulation à l'alcool à 68°. On sait que la coagulation du lait à l'alcool correspond à un état d'instabilité de la caséine résultant soit de la formation d'une certaine quantité d'acide lac-

tique dans le lait, soit d'un début de protéolyse de la caséine elle-même, soit des deux phénomènes réunis.

Le tableau V montre que de nombreux échantillons coagulent après 24 heures d'incubation à 24°. Nous verrons plus loin l'importance de ce fait : la coagulation à l'alcool peut être utilisée comme épreuve de conservation du lait bouilli.

TABLEAU V

Nombre de spores dans 32 échantillons de lait aussitôt après l'ébullition. Nombre de germes et coagulation à l'alcool après incubation de 24 heures à différentes températures.

Numéros des échantillons	Nombre de spores après ébullition		Température d'incubation	Après incubation de 24 heures			
				Lait chauffé jusqu'à montée		Lait bouilli 10 minutes	
	Technique 1	Technique 2		Nombre de germes	Coagulation à l'alcool	Nombre de germes	Coagulation à l'alcool
1		41		43			
2		27		37			
3		19	15°	40			
4		18		37			
5		14		35			
6		28		30			
moyennes		24.5		37			
7		28		$38 \cdot 10^3$			
8		36		$28 \cdot 10^3$			
9		16		$30 \cdot 10^3$			
10		25		$32 \cdot 10^3$			
11		14	18°	$32 \cdot 10^3$			
12		31		$0{,}27 \cdot 10^3$			
13		9		$0{,}26 \cdot 10^3$			
14		14		$0{,}27 \cdot 10^3$			
moyennes		21,6		$20 \cdot 10^3$			
15	0	0		$0{,}4 \cdot 10^6$		$0{,}001 \cdot 10^6$	
16	9	7		$9 \cdot 10^6$		$0{,}16 \cdot 10^6$	
17	7	5		$0{,}1 \cdot 10^6$			
18	25	23		$4.3 \cdot 10^6$		$2{,}6 \cdot 10^6$	
19	25	28		$5.5 \cdot 10^6$		$0{,}04 \cdot 10^6$	
20	29	30		$1{,}7 \cdot 10^6$		$2{,}5 \cdot 10^6$	
21	4	5		$0{,}5 \cdot 10^6$	—	$2{,}8 \cdot 10^6$	—
22	18	15	24°	$6{,}7 \cdot 10^6$	+	$3 \cdot 10^6$	—
23	32	29		$4{,}5 \cdot 10^6$	+	$2 \cdot 10^6$	—
24		12		$2{,}5 \cdot 10^6$	+	$4{,}4 \cdot 10^6$	+
25		13		$8{,}4 \cdot 10^6$	+	$0{,}01 \cdot 10^6$	—
26		24		$13 \cdot 10^6$	+		—
27		10		$4{,}4 \cdot 10^6$	—	$0{,}1 \cdot 10^6$	—
28		46		$7{,}2 \cdot 10^6$	+	$3{,}5 \cdot 10^6$	—
29		36		$1{,}1 \cdot 10^6$	—	$0{,}001 \cdot 10^6$	—
30		20		$7{,}6 \cdot 10^6$		$0{,}5 \cdot 10^6$	
31		12		$8{,}3 \cdot 10^6$		$1{,}9 \cdot 10^6$	
32		10		$5 \cdot 10^6$		$2{,}2 \cdot 10^6$	
moyennes		17,9		$5{,}5 \cdot 10^6$		$1{,}6 \cdot 10^6$	

D. — Nature des germes résistant à l'ébullition.

1° Méthode.

Huit échantillons de 2 litres de lait du commerce ont été divisés en deux portions : l'une des portions était simplement portée à l'ébullition tandis que l'autre était maintenue à l'ébullition pendant 10 minutes. Le lait de chacune des portions était ensuite réparti en flacons stériles et ceux-ci incubés à 30° jusqu'à altération visible, c'est à dire pendant 1 à 15 jours.

Plusieurs groupes d'échantillons ont alors été constitués selon l'aspect de l'altération. Dans chaque groupe, on a isolé et identifié les germes donnant des colonies d'aspects différents, sur gélose nutritive en aérobiose ou sur gélose VF en anaérobiose.

Les anaérobies ont été identifiés selon les méthodes classiques en se basant sur les caractères suivants : morphologie, mobilité, aspect des colonies, vitesse de culture, abondance des gaz, altérations du lait, production de H_2S et d'indol ; fermentation du saccharose, de l'amidon, de la glycérine et de la mannite.

Les aérobies ont été étudiés selon la méthode décrite par Smith et al. (7), et par Knight et Proom (8) et identifiés d'après les caractères suivants : morphologie, position de la spore, aspect des colonies sur gélose nutritive et sur gélose à pH 9,6 ; action sur le glucose, l'arabinose, le xylose et l'amidon ; utilisation du citrate et de l'urée ; production de lécithinase, caractères d'aérobiose.

2° Résultats et discussion.

a) Deux échantillons ont présenté dans tous les flacons, quelle que soit la durée de l'ébullition, un aspect caractérisé par une digestion gazeuse rapide apparaissant entre la 12e et la 48e heure d'incubation. Nous avons isolé de tous les flacons *Welchia perfringens* en culture pure.

b) Dans tous les autres flacons, les altérations ont présenté les aspects suivants : coagulation ou absence de coagulation ; digestion plus ou moins rapide du caillot laissant exsuder un liquide jaune ou protéolyse en surface et dépôt d'un sédiment blanc au fond du flacon. De chaque flacon, nous avons isolé au maximum deux espèces de sporulés aérobies. Sur 18 germes identifiés, nous avons trouvé 10 fois *Bacillus licheniformis* ; les autres germes sont *Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Bacillus pumilus, Bacillus circulans*.

c) Les germes que nous avons isolés et identifiés sont les mêmes que ceux identifiés par de nombreux auteurs, au cours de travaux concernant soit l'hygiène du lait cru, soit la flore des laits dits « stérilisés ».

Paquet et Gauvin (9) trouvent *Clostridium perfringens* (*Welchia*

perfringens) dans 18,3 p. 100 des laits pasteurisés canadiens qu'ils ont examinés. BUTTIAUX et BEERENS (10) trouvent le même germe dans 16 p. 100 des laits pasteurisés mis en vente dans le commerce dans les départements du nord de la France.

Les sporulés aérobies ont surtout été étudiés dans le lait « stérilisé ». SMITH, GORDON et CLARK (7) identifient 230 germes, qui sont : *B. subtilis* et *B. licheniformis*, 204 ; *B. pumilus*, 10 ; *B. coagulans*, 8 ; *B. megatherium*, 4 ; *B. cereus*, 2 ; *B. mycoïdes*, 1 ; *B. laterosporus*, 1 ; de leur côté GRINSTED et CLEGG (11) isolent de lait stérilisé à l'usine ou au laboratoire, *B. subtilis*, 68 ; *B. licheniformis*, 190 ; *B. pumilus*, 2 ; *B. circulans*, 10 ; *B. brevis*, 31 ; et *B. macerans*, 4. GALESLOOT (21) trouve dans les laits pasteurisés au laboratoire à différentes températures : *B. cereus*, *B. megatherium*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. circulans*.

E. — Vitesse de développement des sporulés dans le lait bouilli.

Nous avons vu que du lait bouilli conservé à 24° contient après 24 heures un nombre souvent très élevé de microorganismes. Mais ce nombre est variable d'un échantillon de lait à l'autre même lorsque ces échantillons de lait contiennent à l'origine, aussitôt après l'ébullition, un nombre de spores assez voisin. Ainsi que nous l'avons vu, le nombre de germes après incubation est en général plus bas lorsque l'ébullition a duré longtemps. Mais on trouve cependant aussi le phénomène inverse : ceci peut s'expliquer soit par une thermo-résistance différente des espèces microbiennes présentes dans le lait (certaines espèces peu sensibles n'étant pas détruites par l'ébullition tandis que d'autres subissent une destruction proportionnelle à la durée du chauffage), soit par une modification de la vitesse de croissance des microorganismes dans le lait à la suite d'un chauffage plus ou moins prolongé de celui-ci (17).

Nous avons vu aussi qu'une proportion élevée des laits bouillis conservés 24 heures coagulent à l'alcool. On peut se demander quelle signification attribuer à ce caractère ; en effet, dans un lait cru la coagulation à l'alcool apparaît en général à partir d'une certaine acidité et marque un stade de la fermentation lactique, sans signification hygiénique particulière ; au contraire, dans le lait bouilli, qui ne subit pas la fermentation lactique, le moment d'apparition de la coagulation correspond à un stade de dégradation des substances azotées qu'il est intéressant, du point de vue de l'hygiène, de préciser.

Dans cette partie de notre travail nous avons étudié la thermo-résistance de quelques-uns des sporulés isolés du lait pour déterminer l'influence qu'une ébullition prolongée peut avoir sur eux. Nous avons mesuré leur croissance dans le lait bouilli et leur action sur les différents

constituants du lait mesurée par la protéolyse de la caséine, par les variations du pH et par la stabilité du lait à l'alcool.

1° Méthodes.

Pour travailler dans des conditions bien déterminées et reproductibles, et obvier aux difficultés expérimentales provenant d'un développement plus ou moins rapide des sporulés présents dans les échantillons de lait du commerce, il faut partir d'un lait dont la flore sporulée est connue. La meilleure méthode est celle qui consiste à ensemencer un lait propre, très pauvre en spores, avec un nombre connu de spores de l'espèce à étudier.

a) Préparation et titrage des suspensions de spores de germes aérobies.

Trois germes, isolés des essais précédents, ont été utilisés. Ce sont : *Bacillus cereus* C J 1, *Bacillus subtilis* S J 2, *Bacillus licheniformis* L J 5.

Plusieurs tubes de gélose nutritive sans peptone (1) sont ensemencés abondamment à partir d'une culture de 24 heures en bouillon. Après 8 jours d'incubation à 30° la surface de la gélose est râclée et les germes sont mis en suspension dans une solution tamponnée (2).

La suspension obtenue est filtrée stérilement sur papier Chardin, chauffée à 80° pendant 10 minutes pour détruire les formes végétatives, puis conservée à + 4°. Le titrage est effectué par numération sur boîtes de Pétri en utilisant le milieu nutritif gélosé indiqué plus haut ; la lecture est faite après 24 heures (*B. cereus*) ou 48 heures (*B. subtilis et B. licheniformis*) d'incubation à 30°. Le titre de la suspension est alors ramené à 100 000 spores par cm^3. Le titre est resté constant au cours de six mois d'observation.

b) Mesure de la thermo-résistance des spores de germes aérobies du lait.

Du lait cru recueilli aseptiquement est ensemencé avec la suspension de spores de façon à obtenir environ 100 spores au cm^3 (3) puis il est réparti en tubes de 18 × 180. Ceux-ci sont plongés dans un bain-marie réglé à 80°, 90° ou 100° pendant un temps plus ou moins long compté à partir du moment où la température marquée par un thermomètre placé dans un tube témoin indique 78°, 88° ou 97°5.

Les tubes sont aussitôt refroidis et la numération est faite suivant la technique déjà décrite.

(1) composition du milieu : extrait de viande 10 ; ClNa 5 ; gélose 15 ; eau 1000.

(2) formule C de Butterfield.

PO_4H_2K 34 g dans 500 cm^3 ajuster à pH 7,2 par NaOH et compléter à 1 litre

solution précédente de phosphate	1,25	cm^3
Cl_2Ca, $4H_2O$ 0,1 M	2,5	cm^3
Cl_3Fe, $6H_2O$ 0,001 M	0,5	cm^3
SO_4Mg, $7H_2O$ 0,04 M	2,5	cm^3
Eau distillée	1000	cm^3

(3) C'est-à-dire un nombre voisin de celui trouvé dans les laits du commerce.

c) PRÉPARATION ET TITRAGE DES SUSPENSIONS DE SPORES DE GERMES ANAÉROBIES.

La sporulation de *W. perfringens* a rarement lieu en culture ; nous avons utilisé à sa place un germe anaérobie souvent rencontré dans le lait *Clostridium sporogenes* souche Cl3.

La culture est faite en bouillon glucosé dans un ballon rempli jusqu'au col. Après 8 jours d'incubation à 30°, on filtre sur papier Chardin pour éliminer les agglomérats de germes ; puis on lave trois fois dans la solution tamponnée en recueillant les spores par centrifugation. La suspension est chauffée à 80° pendant 10 minutes, puis conservée à + 4°. Le titrage de la suspension est fait par la méthode des dilutions de McCRADY en utilisant le milieu de HIRSCH et GRINSTED (1) (18) en tubes de HALL remplis jusqu'à l'étranglement. La lecture est faite après 48 heures d'incubation à 30°. La suspension obtenue titre 45 000 spores par cm³.

d) ÉBULLITION ET INCUBATION.

Le lait cru est ensemencé (généralement avec 100 spores par cm³) et mis à bouillir puis réparti dans des flacons de 150 cm³ à raison de 100 cm³ par flacon. Ceux-ci sont aussitôt placés au bain-marie à 24° et dans certains cas à 18°. Chaque flacon ne sert que pour un seul prélèvement.

e) ÉTABLISSEMENT DES COURBES DE CROISSANCE.

Des numérations sont effectuées en prélevant à intervalles réguliers un flacon dans le bain-marie. La numération des germes aérobies est faite par la méthode des dilutions et culture sur milieu gélosé en boîte de Pétri. On utilise le même milieu que pour le titrage des suspensions de spores ; la lecture est faite après 24 et 48 heures d'incubation à 30°.

Les anaérobies sont dénombrés par la méthode de BREED par examen direct sur lame.

f) COAGULATION A L'ALCOOL ET MESURE DU pH.

2 cm³ de lait sont additionnés de 2 cm³ d'alcool à 68° neutralisé et additionné de pourpre de bromocrésol. On observe la présence ou l'absence de coagulation.

La mesure du pH est faite avec une électrode de verre.

g) MESURE DE LA PROTÉOLYSE PAR TITRAGE DE L'AZOTE SOLUBLE.

Les protéines du lait sont précipitées par l'acide trichloracétique selon la méthode de ROWLAND (12) et l'azote du filtrat est dosé au Kjeldahl.

(1) Composition du milieu : extrait de viande 10 ; peptone 10 ; acétate de sodium 5 ; extrait de levure 3 ; amidon soluble 1 ; cystéine 0,5 ; glucose 10 ; eau 1000.

2° **Résultats.**

a) Thermo-résistance.

Les courbes des figures 1 et 2 expriment le comportement des spores au cours de l'ébullition du lait. Alors que les spores de *B. cereus* et de *B. licheniformis* subissent une destruction importante, celles de *B. subtilis* non seulement résistent à l'ébullition mais voient encore leur germination activée par un chauffage prolongé à la température d'ébullition du lait.

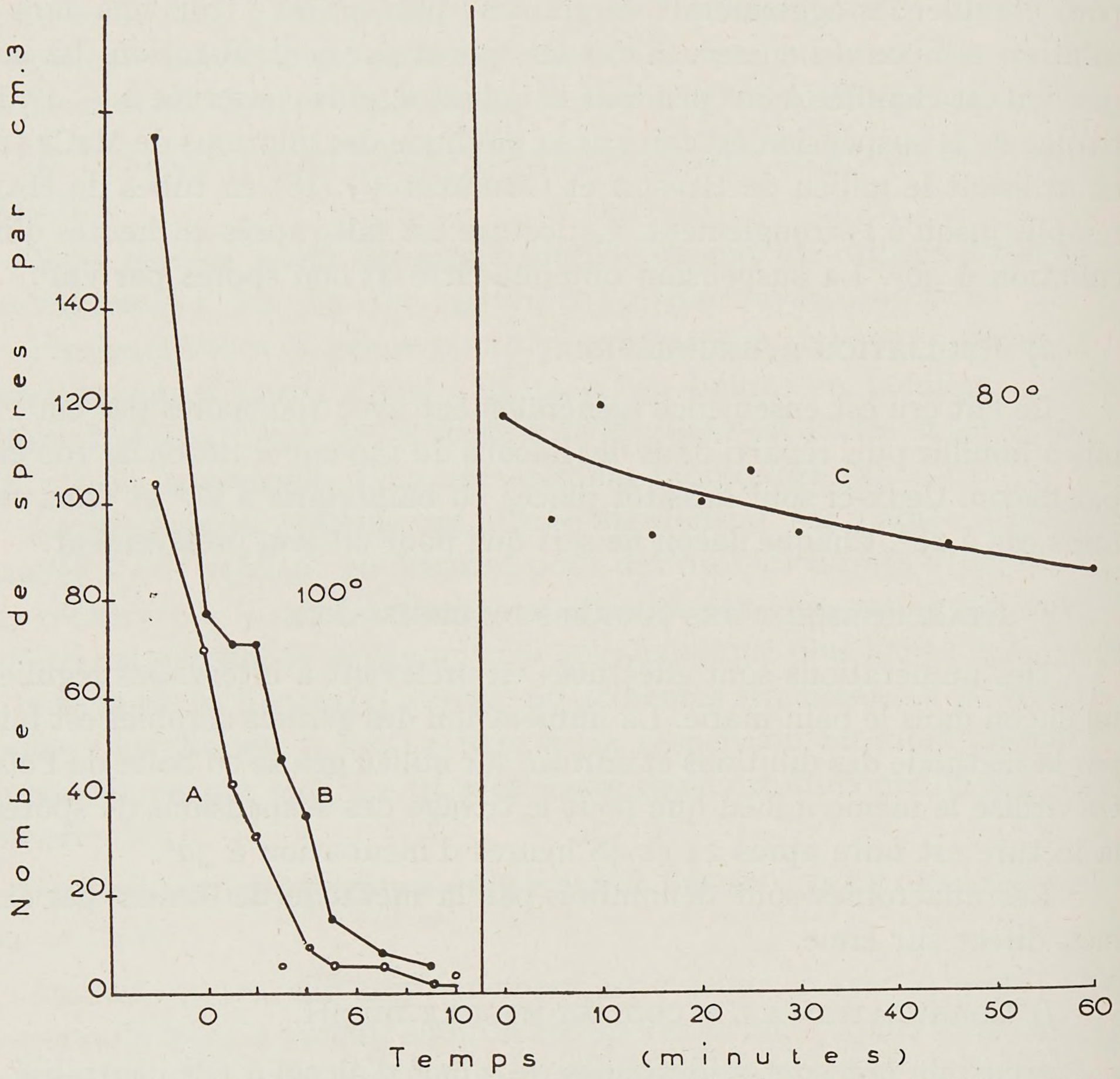


FIG. 1. — Action de la chaleur sur les spores de *B. licheniformis* (A) et de *B. cereus* (B et C) à 100° et à 80°

On remarque sur la figure 2, qu'il faut un temps de maintien minimum de 20 minutes à 100° pour obtenir le nombre maximum de colonies de *B. subtilis* sur gélose et qu'il faut maintenir plus d'une heure la température à 80° ou 90° pour obtenir le même effet d'activation.

Il est probable que de nombreuses autres souches de sporulés présentent le même comportement que la souche de *B. subtilis*, S.J.2. La présence de tels germes dans le lait explique alors pourquoi certains échantillons (échantillons 20, 21, 24, du tableau V) s'altèrent d'autant plus vite qu'ils ont bouilli plus longtemps.

b) Croissance et altération du lait par *B. cereus* (fig. 3 et 4).

La croissance de *B. cereus* dans le lait est très rapide. Un lait renfermant 100 spores par cm³ et maintenu à l'ébullition pendant 1 à 10 minutes contient, après une conservation de 24 heures à 24°, 10 millions de germes par cm³. Conservé à 18° il lui faut 48 heures pour atteindre le même chiffre.

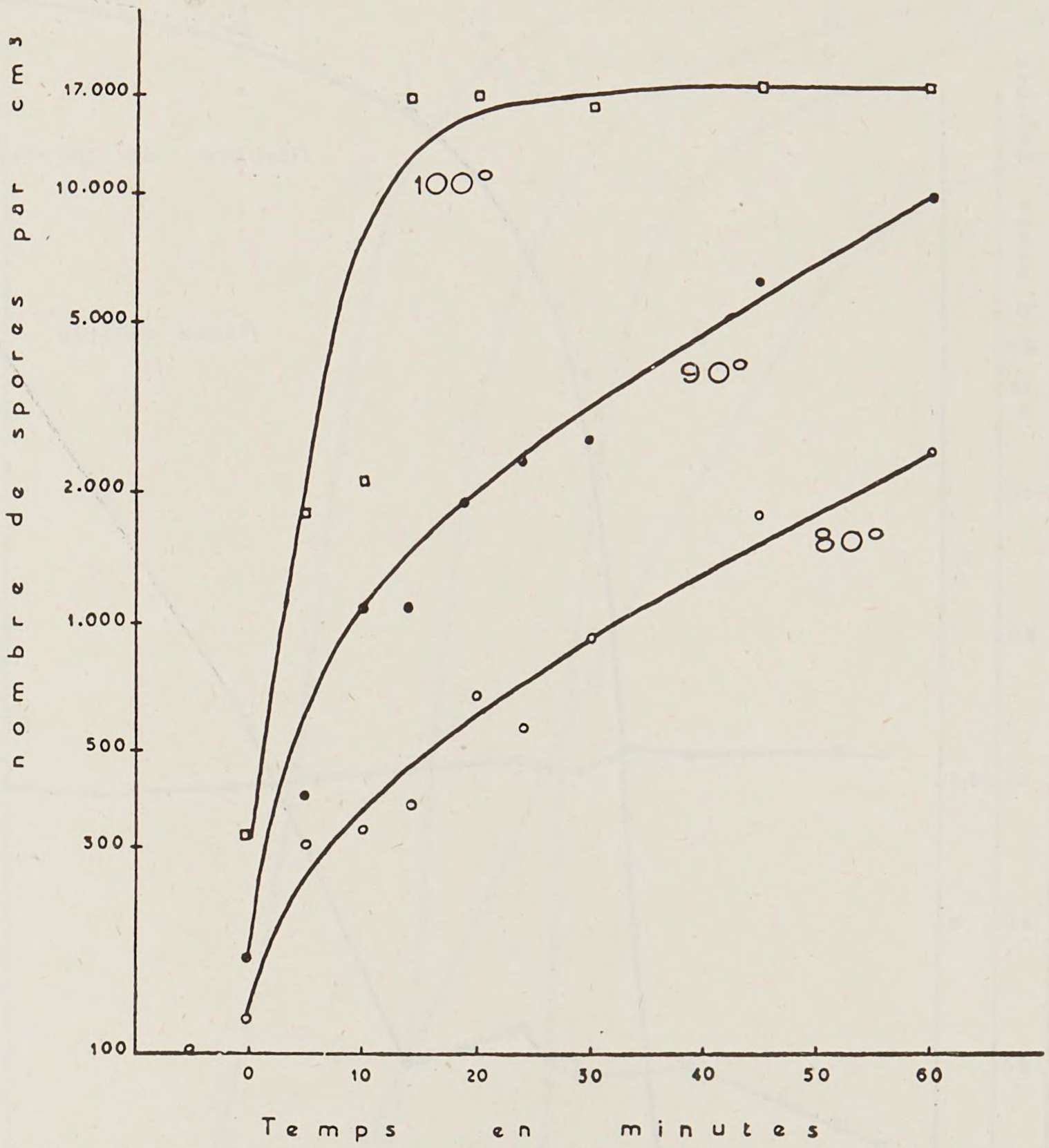


FIG. 2. — Action de la chaleur sur les spores de *B. subtilis*. Activation par la chaleur de la germination.

Une prolongation de l'ébullition du lait ne modifie pas sensiblement la vitesse de croissance de *B. cereus* mais, en réduisant le nombre de spores capables de germer, elle augmente la durée de conservation du lait. Si l'on prend comme limite de conservation le moment où le lait coagule à l'alcool, un lait bouilli moins d'une minute se conserve moins de 18 heures à 24°.

Il n'y a pas de variation sensible du pH du lait au cours de cette période. Le phénomène de coagulation par l'alcool se produit vers la fin de la phase exponentielle de croissance ; il paraît lié à la protéolyse de la caséine puisqu'on observe la coagulation à l'alcool au moment où cette protéolyse devient mesurable (fig. 3). Le point où la protéolyse de la caséine devient mesurable peut aussi être considéré comme le début de la putréfaction et représente donc le moment où le lait bouilli doit être jugé

impropre à la consommation. La coagulation du lait à l'ébullition ou même la coagulation à la température ambiante, qui limitent en pratique la conservation et la consommation du lait, ne se produisent que plusieurs heures plus tard. Au cours de la conservation du lait bouilli, il y a donc

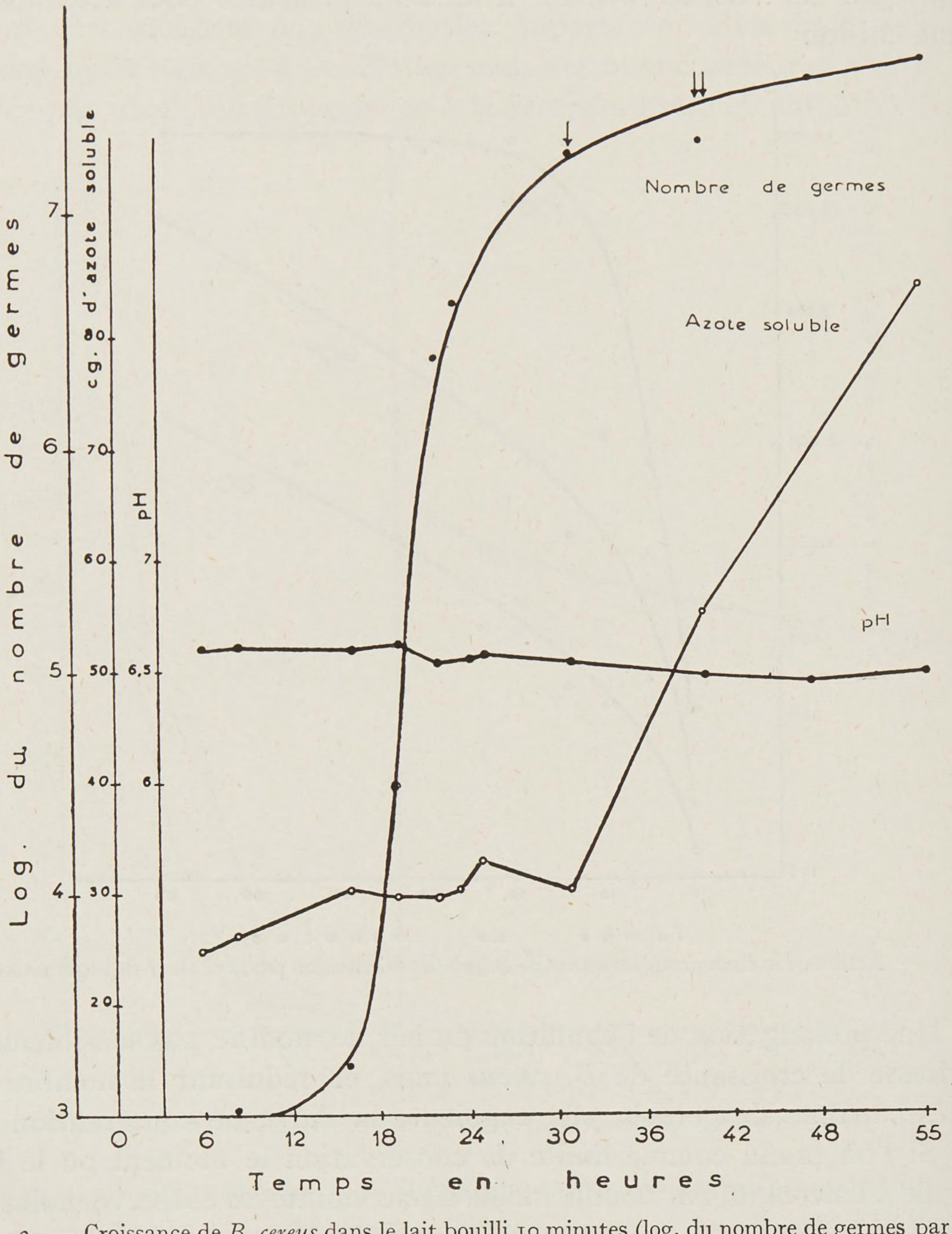


FIG. 3. — Croissance de *B. cereus* dans le lait bouilli 10 minutes (log. du nombre de germes par cm³). Ensemencement : 100 spores par cm³ ; température d'incubation : 24°. Variations du taux d'azote soluble (centigrammes d'azote par cm³) et du pH

↓↓ coagulation spontanée, ↓ coagulation à l'alcool.

une période qui précède l'apparition des signes visibles d'altération pendant laquelle le lait, en voie de putréfaction, devrait être rejeté de la consommation. Les résultats de l'enquête exposés dans la première partie de notre travail laissent supposer qu'en fait le lait est souvent consommé à ce

stade. Il doit en être ainsi, par exemple, au cours de la saison chaude lorsque le lait est conservé pendant plus de 24 heures sans refroidissement après l'ébullition.

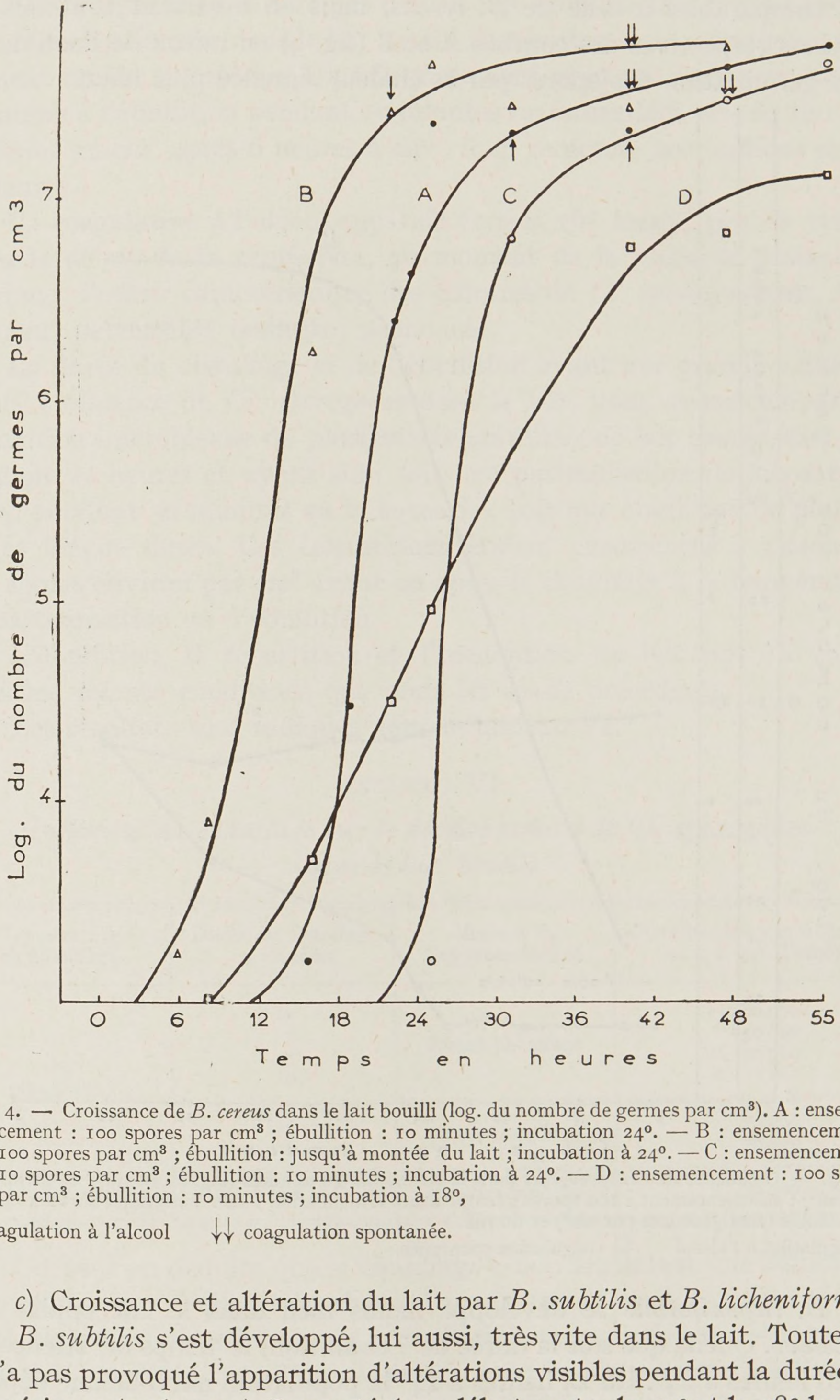


FIG. 4. — Croissance de *B. cereus* dans le lait bouilli (log. du nombre de germes par cm³). A : ensemencement : 100 spores par cm³ ; ébullition : 10 minutes ; incubation 24°. — B : ensemencement : 100 spores par cm³ ; ébullition : jusqu'à montée du lait ; incubation à 24°. — C : ensemencement : 10 spores par cm³ ; ébullition : 10 minutes ; incubation à 24°. — D : ensemencement : 100 spores par cm³ ; ébullition : 10 minutes ; incubation à 18°,

↓ coagulation à l'alcool ↓↓ coagulation spontanée.

c) Croissance et altération du lait par *B. subtilis* et *B. licheniformis*.

B. subtilis s'est développé, lui aussi, très vite dans le lait. Toutefois il n'a pas provoqué l'apparition d'altérations visibles pendant la durée de l'expérience (71 heures). La protéolyse débute entre la 40e et la 48e heure.

La population microbienne dépasse 1 million en 24 heures et 100 millions en 55 heures.

Les courbes de croissance, établies après l'ébullition de 1 à 10 minutes sont comparables à celle de *B. cereus*, mais en inversant toutefois les positions respectives des courbes A et B (fig. 4) en raison de l'activation de la germination des spores par la chaleur signalée plus haut.

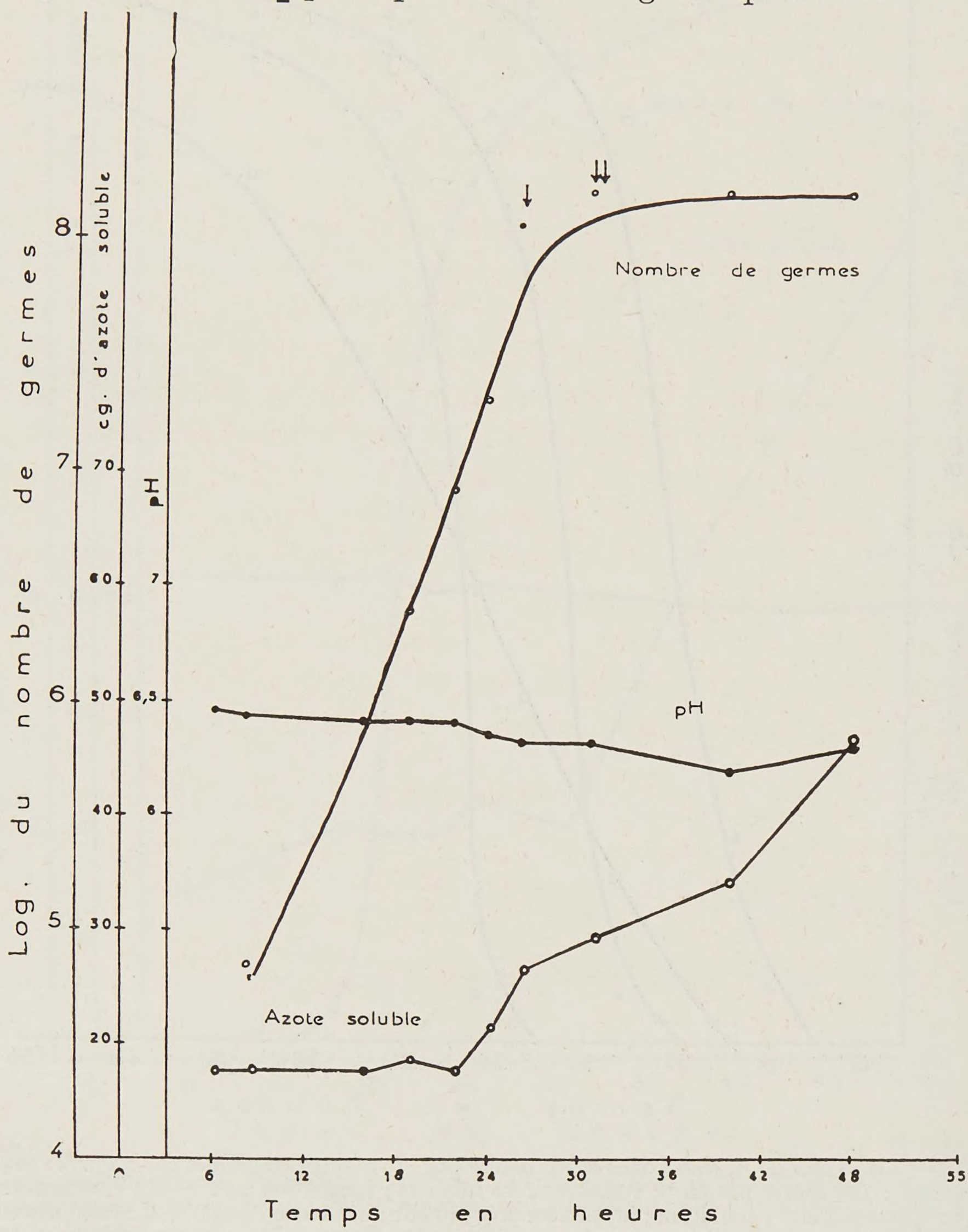


FIG. 5. — Croissance de *Cl. sporogenes* dans le lait bouilli 10 minutes (log. du nombre de germes par cm^3) ; ensemencement : 100 spores ; température d'incubation : 24°. Variations du taux d'azote soluble (centigrammes par cm^3) et du pH

↓ coagulation à l'alcool ↓↓ coagulation spontanée.

B. licheniformis se développe moins bien dans le lait bouilli que *B. cereus*. Quelle que soit la durée de l'ébullition, le temps de latence est de 20 heures à 24°. En 24 heures à 24° la population microbienne dépasse 100 000 germes par cm^3. En 48 heures elle atteint 10 millions par cm^3. Il

ne s'est produit dans les conditions de nos expériences (55 heures) ni coagulation à l'alcool, ni coagulation à l'ébullition, ni protéolyse notable.

d) *Clostridium sporogenes* (fig. 5).

Cl. sporogenes ne cultive pas dans le lait simplement porté à l'ébullition. Mais il présente, dans le lait bouilli 10 minutes, une croissance extrêmement rapide et précoce. Un lait ensemencé avec 100 spores au cm^3 et maintenu à l'ébullition pendant 10 minutes renferme déjà près de 100 000 bactéries au cm^3 après 6 heures à 24° ; il en renferme 100 millions après 26 heures.

La coagulation à l'alcool apparaît vers la 26e heure, peu de temps après le début de la protéolyse, au moment de la phase de croissance maxima : l'odeur caractéristique des cultures de *Cl. sporogenes* est, à ce moment, perceptible mais peu prononcée.

La durée du chauffage et de l'ébullition ayant une grande influence sur la croissance de *Cl. sporogenes* dans le lait, nous avons comparé la population microbienne de plusieurs échantillons de lait conservés à 24° pendant 22 heures et ayant subi soit une pasteurisation de laboratoire (63°5, pendant 30 minutes au bain-marie), soit une ébullition de plus ou moins longue durée. Ces échantillons étaient ensemencés à raison de 100 spores environ par cm^3 avant ou après le chauffage à la température de pasteurisation ou d'ébullition.

L'ébullition, la répartition et l'incubation du lait ont été faites dans les mêmes conditions que pour les essais précédents.

Les résultats sont indiqués dans le tableau VI.

TABLEAU VI

Influence du chauffage sur le développement de Cl. sporogenes *dans le lait bouilli*

Température de chauffage	Durée du chauffage en minutes	Moment de l'ensemencement	Nombre de germes après 24 h à 24° (Breed)
100° (ébullition)	10	Avant chauffage	15 000 000
	7		750 000
	3		< 20 000
	0		< 20 000
	10	Après chauffage	< 20 000
	0		< 20 000
63°5 pasteurisation	30	Avant chauffage	< 20 000

On peut en déduire que le chauffage a non seulement une action sur le lait lui-même (l'ébullition chasse l'air du lait et rend le milieu réducteur) mais encore sur les spores, probablement en « activant » leur germination. Il paraît légitime de généraliser la première de ces actions à d'autres anaérobies, en particulier à *W. perfringens* dont on sait qu'il est avec *Cl.*

sporogenes un des germes anaérobies le plus souvent rencontrés dans le lait. On voit ainsi qu'une ébullition prolongée du lait, loin d'améliorer les qualités de conservation de celui-ci, peut le rendre plus favorable à la croissance de certains germes sporulés.

Précisons que les mêmes essais, reproduits en laissant le lait dans la casserole pendant l'incubation au lieu de le répartir en flacons, donnent des résultats comparables : la croissance des germes est même encore plus rapide.

3° **Discussion.**

Les germes sporulés aérobies et anaérobies que l'on rencontre habituellement dans tous les laits sont capables de se développer rapidement après l'ébullition et pendant la conservation du lait à température élevée (24°). Ce développement est tel que la putréfaction du lait débute bien souvent avant le délai de 24 heures qui représente dans beaucoup de cas le délai d'utilisation pratique du lait et aussi avant l'apparition des signes visibles d'altération. On sait que la culture de certains sporulés dans le lait conduit à une production de toxines (13) et que des toxi-infections alimentaires dues au lait sont attribuées à *W. perfringens* (14, 15) et à certaines bactéries du genre *Bacillus* (16). Si l'on tient compte du fait que de nombreuses personnes conservent le lait bouilli pendant plus de 24 heures, on est amené à penser que l'ébullition domestique du lait ne donne des garanties hygiéniques sérieuses que si elle est faite dans des conditions bien définies.

Quelles sont ces conditions ?

La durée de l'ébullition d'abord : les traités d'hygiène considérant que le lait « monte » à 80° recommandent souvent une ébullition de 3 à 10 minutes, temps nécessaire pour atteindre 100°. En fait tous les laits qu'ils soient traits depuis quelques instants seulement ou à la limite de leur conservation ne « montent » qu'aux environs de 97°. Puisque le bacille tuberculeux, le plus résistant des pathogènes non sporulés, est détruit à 75° en quelques secondes, il n'y a aucune raison pour prolonger le chauffage après la montée du lait. Prolonger l'ébullition c'est sans doute détruire quelques spores mais aussi en « activer » d'autres et c'est surtout créer dans la casserole elle-même un milieu favorable à la croissance des anaérobies, bien plus redoutables que les aérobies qui cultivent dans un lait bouilli moins longtemps.

La durée de conservation et le refroidissement ensuite : si le lait doit être consommé dans l'heure qui suit l'ébullition il est inutile, au point de vue bactériologique, de le refroidir. Pendant un délai de 6 heures environ le nombre de bactéries présentes n'augmente que peu ou pas. Mais si le lait doit être conservé plus longtemps il est indispensable de le refroidir

et de le maintenir aux environs de 15° : à cette température, en 24 heures, les sporulés ne se développent pratiquement pas.

Il est curieux de constater que les recommandations relatives à l'ébullition domestique du lait, souvent largement diffusées par la grande presse, insistent toujours sur la prolongation de l'ébullition, qui est en fait inutile ou même nuisible, mais ne mentionnent que rarement le refroidissement qui est, au point de vue bactériologique, un facteur indispensable à la bonne conservation du lait bouilli.

CONCLUSION

Dans l'état sanitaire actuel du cheptel laitier français (8,5 p. 100 de bovins tuberculeux) (19), l'ébullition domestique du lait est une mesure d'hygiène indispensable pour toutes les personnes qui ne disposent que de lait cru. De plus elle est une mesure de sagesse pour celles qui utilisent le lait pasteurisé livré en bidons, très souvent recontaminé au cours des manipulations de distribution. Enfin l'ébullition est encore nécessaire pour le lait destiné à l'alimentation des nourrissons, car la flore même banale de ce lait doit être réduite au minimum au moment où le lait est absorbé par l'enfant. Dans tous ces cas, le lait sera conservé au froid après l'achat et porté à l'ébullition immédiatement avant l'emploi ou encore, mais ce procédé est moins économique, le lait sera refroidi aussitôt après l'ébullition puis conservé au frais (15° maximum) et consommé dans les 24 heures. Nous rejoignons ici les conclusions de J. RENAULT et P. P. LÉVY (4) que nous avons citées au début de cet exposé.

A côté de l'intérêt indiscutable qu'il présente dans les conditions qui viennent d'être énumérées, le procédé de l'ébullition domestique comporte certains inconvénients inhérents au procédé lui-même ou aux conditions pratiques dans lesquelles il est appliqué. En France, par exemple, l'ébullition du lait au domicile du consommateur est une habitude presque générale. Mais quels que soient l'origine du lait et les traitements qu'il a subis avant la vente, quelle qu'en soit la destination (consommation à l'état liquide ou utilisation dans la cuisine), aucune règle précise n'est appliquée pour cette ébullition, en particulier le refroidissement du lait après l'ébullition est loin d'être une pratique courante.

L'ébullition domestique est un procédé onéreux par les pertes de substances nutritives qu'il entraîne, les dépenses d'énergie calorifique qu'il nécessite et enfin le travail qu'il impose à la ménagère. Dans le cas de la consommation urbaine l'ébullition succède presque toujours à une pasteurisation, indispensable pour la conservation du lait pendant son transport et sa distribution. Cette ébullition du lait pasteurisé accroît encore notablement le prix de revient du lait à la consommation.

L'ébullition n'apporte pas toujours une garantie d'hygiène totale ;

en effet, les spores de germes aérobies ou anaérobies susceptibles de se développer rapidement après l'ébullition sont présentes dans tous les laits que nous avons examinés. Les laits contenant ces spores, soumis à l'ébullition et conservés à 24°, ne sont en général pas visiblement altérés après 24 heures mais ils contiennent déjà une nombreuse population microbienne : cette population est, le plus souvent, de plusieurs millions de germes par cm^3. Elle est parfois constituée de germes capables de provoquer des toxi-infections alimentaires : le lait a déjà subi à ce moment un début de putréfaction.

Au point de vue de la destruction des microbes pathogènes, l'ébullition n'est pas supérieure à une pasteurisation bien faite.

Au point de vue de la durée de conservation du lait, elle n'offre pas non plus d'avantages définis sur le procédé de pasteurisation correctement appliqué, c'est à dire comportant une répartition à l'abri de toute contamination et une distribution en récipients fermés.

Reçu pour publication le 3 *avril* 1956.

Nous exprimons notre reconnaissance à M. Mocquot qui, par ses conseils, nous a guidé tout au cours de ce travail.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Wilson (G. S.). — The pasteurisation of milk. Arnold, Londres, 1948.
(2) Duclaux (E.). — Principes de laiterie. Armand Colin, Paris, 1890.
(3) Pasteur (L.). — Œuvres. Masson, Paris, 1922, **2,** 194, 254, 262.
(4) Renault (J.) et Lévy (P. P.). — Revue d'hygiène et de police sanitaire, **38,** 737, 1916.
(5) Kay (H. D.) et coll. — La pasteurisation du lait. Organisation mondiale de la santé, Genève, 1954.
(6) Ridgway (J. D.). — Some recent observations on the bacteriology of sterilized milk. *J. Appl. Bact.*, **18,** 374-387, 1955.
(7) Smith (N. R.), Gordon (R. E.) et Clark (F. E.). — Aerobic mesophilic sporeforming bacteria. *Misc. Publ. U. S. Dep. Agric.*, nº 559, 1946.
(8) Knight (B. C. J. G.) et Proom (H.). — A comparative survey of the nutrition and physiology of mesophilic species in the genus *Bacillus*. *J. Gen. Microb.*, **4,** 508-538, 1950.
(9) Paquet (B.) et Gauvin (D.). — Fréquence et signification des clostridium à fermentation gazeuse dans le lait. *Canad. J. publ. Health*, **44,** 22, 1953.
(10) Buttiaux (R.) et Beerens (H.). — Les indices de propreté originelle des laits pasteurisés. *Rev. path. gen. comp.*, **53,** 1448-1452, 1953.
(11) Grinsted (E.) et Clegg (L. F. L.). — Spore forming organisms in commercial sterilized milk. *J. Dairy Res.*, **22,** 178-190, 1955.
(12) Rowland (S. J.). — The determination of the nitrogen distribution in milk. *J. Dairy Res.*, **9,** 43-46, 1938.
(13) Prévot (A. R.) et Thouvenot (H.). — Le lait peut-il transmettre les maladies à anaérobies ? *Ann. Inst. Past.*, **83,** 180-185, 1952.
(14) Hobbs (B. C.), Smith (M. E.), Oakley (C. L.), Warrack (G. H.) et Cruickshank (J. C.). — *Clostridium welchii* food poisoning. *J. Hyg.*, **51,** 75-101, 1953.

(15) McCLUNG (L. S.). — Human food poisoning due to the growth of *Clostridium perfringens* in freshly cooked chicken. *J. Bact.*, **50,** 229-234, 1945.

(16) MEYER (R.). — Ueber zwei Nahrungsmittelvergiftungen durch Keime der Mesentericus-Subtilis-Gruppe. *Zeitschr. Hyg. Infekt. Krankh.*, **133,** 211-216, 1951.

(17) AUCLAIR (J. E.) et PORTMANN (A.). — Influence du chauffage du lait sur le développement des bactéries. *Ann. Inst. Nat. Rech. agron.*, Série E (*Ann. techn. agric.*), **4,** 121-131, 1955.

(18) HIRSCH (A.) et GRINSTED (E.). — Methods for the growth and enumeration of anaerobic spore formers from cheese with observation on the effect of nisin. *J. Dairy Res.*, **21,** 101-109, 1954.

(19) VUILLAUME (R.). — Organisation actuelle de la lutte contre la tuberculose bovine. *Bull. Acad. Vet.*, **28,** 283-298, 1955.

(20) MOCQUOT (G.). — Aspects techniques et hygiéniques du problème des laits destinés à la consommation. *Ann. Nutr.*, **9,** 251-270, 1955.

(21) GALESLOOT (Th. E.). — Some aspects of the bacteriology of pasteurised milk. Neth. Milk and Dairy J., **7**, 1-14, 1953.

LA VALEUR NUTRITIVE DES PROTIDES DU LAIT PEUT-ELLE ÊTRE AFFECTÉE PAR LE CAILLAGE ET PAR L'ÉLIMINATION DU LACTOSÉRUM?

PAR

Lucie RANDOIN et Jean CAUSERET

Laboratoire de Physiologie de la Nutrition, Paris

PLAN DU MÉMOIRE

I. — **Introduction.**
II. — **Conditions expérimentales.**
III. — **Résultats obtenus.**
IV. — **Discussion des résultats.**
V. — **Conclusion.**
Bibliographie.

I. — INTRODUCTION

Dans un mémoire antérieur (6), nous avons montré, chez le Rat, que l'utilisation digestive des protides des fromages est généralement supérieure à celle des protides du lait, mais que leur valeur biologique est moins élevée.

A priori, il est possible de mettre l'amélioration de l'utilisation digestive en relation avec la dégradation des protéines du caillé au cours de la maturation des fromages.

Quant à l'abaissement de la valeur biologique, on peut se demander s'il ne résulte pas, au moins pour une part, de l'élimination des protéines solubles du lait (lactalbumine et lactoglobuline) au cours de l'égouttage du caillé. En effet, chez le Rat et chez le Chien (5,2), l'efficacité de la lactalbumine pour l'entretien et pour la croissance paraît supérieure à celle de la caséine (1). Chez le Rat, MITCHELL assigne d'ailleurs aux protides totaux du lait une valeur biologique de 93 et à la caséine une valeur de 70 seulement (3).

(1) Il en serait de même chez l'Homme d'après EDELSTEIN et LANGSTEIN (1). Mais les expériences de ces derniers ont été critiquées par MUELLER et COX (4), que leurs propres recherches, réalisées sur des adultes, ont conduit à assigner à la caséine et à la lactalbumine la même valeur biologique.

Ces considérations nous ont conduits à rechercher l'influence éventuelle du caillage du lait et de l'égouttage sur les propriétés biologiques des protides des produits obtenus.

II. — CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

L'expérience principale a été réalisée sur trois lots de rats qui recevaient respectivement, comme unique source d'azote :

— un lait pasteurisé (1) (*lot I*) ;

— un caillé égoutté préparé à partir de ce lait (*lot II*) ;

— le même caillé, additionné du lactosérum recueilli au cours de l'égouttage (*lot III*).

De plus, deux lots supplémentaires (*lots IV* et *V*) ont reçu comme source d'azote du Camembert, afin qu'il soit possible de comparer, dans des conditions d'expériences identiques, l'utilisation digestive et la valeur biologique des protides d'un fromage déjà étudié antérieurement à ce point de vue, avec celles des protides du caillé.

Le caillage et l'égouttage ont été conduits de la manière suivante. Le lait a tout d'abord été acidifié par addition de 2 p. 100 d'un levain de ferments lactiques, préparé lui-même à partir d'une souche sélectionnée introduite à la dose de 2 p. 100 dans du lait reconstitué à partir de 9 g de lait en poudre et 91 g d'eau de ville, et stérilisé à l'autoclave à 118° pendant 20 minutes. Après un repos de deux heures environ à 25°C, l'acidité du lait atteignait 25°D. Le lait acidifié de cette manière a été porté à 28°C, additionné de 0,15 ml de présure au $\frac{1}{10\,000}$ par litre, puis abandonné pendant 5 heures à 25°C. Il a ensuite été soumis à un égouttage spontané, sans fragmentation du caillé, jusqu'à ce que la quantité de lactosérum recueillie soit de 0,5 litre par litre de lait. L'égouttage a donc été peu poussé.

Quant aux échantillons de Camembert utilisés, c'étaient tous deux des fromages d'origine, de marques différentes, convenablement affinés. Les teneurs en azote de ces fromages étaient respectivement de 3,20 et 3,57 p. 100.

Le lait (lot I), le caillé égoutté (lot II), le caillé réadditionné du lactosérum recueilli (lot III), ainsi que les deux Camemberts utilisés (lots IV et V), ont été incorporés à un mélange alimentaire de base, de telle sorte que les 5 régimes obtenus renferment des quantités voisines d'azote, correspondant à une teneur en protides théoriquement égale à 10 p. 100. La composition de ces régimes est indiquée dans le *tableau I*.

Chaque lot de rats comprenait de 5 à 9 sujets du sexe mâle, pesant de 70 à 100 g au début de l'expérience.

(1) Lait pasteurisé certifié du commerce.

TABLEAU I

Composition des régimes d'expérience

	Rég. I	Rég. II	Rég. III	Rég. IV	Rég. V
Lait	300	—	—	—	—
Caillé égoutté	—	150	150	—	—
Lactosérum	—	—	150	—	—
Camembert n° I	—	—	—	49	—
Camembert n° II	—	—	—	—	43,5
Amidon	35	35	35	38	39,5
Saccharose	35	35	35	30	30
Huile d'arachide	—	—	—	3	3
Mélange salin spécial	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075
Agar-agar	—	—	—	2	2

Cette dernière a été conduite de la même manière que celle dont les résultats ont été rapportés dans une autre publication (6). Elle a donc compris successivement deux périodes :

— une période d'alimentation ternaire de 9 jours, avec études métaboliques pendant les 6 derniers jours ;

— une période d'alimentation normale de 16 jours, avec études métaboliques pendant les 9 derniers jours : c'est au cours de cette seconde période que les animaux ont reçu les régimes dont la composition figure dans le tableau I.

III. — RÉSULTATS OBTENUS

Le coefficient d'utilisation digestive et la valeur biologique des protides ont été évalués respectivement par la formule de LELU et par celle de MARTIN et ROBISON : on trouvera toutes précisions à ce sujet dans notre précédent mémoire, déjà cité.

Les résultats obtenus sont réunis dans le *tableau II*.

On voit que le C. U. D. des protides du caillé égoutté, donné seul ou réadditionné du lactosérum recueilli, est supérieur à celui des protides du lait, et pratiquement égal à celui des protides des échantillons de Camembert étudiés.

Par contre, la valeur biologique des protides du caillé égoutté est inférieure à celle des protides du lait et du même ordre de grandeur que celle des protides du Camembert. L'addition du lactosérum à ce même caillé relève la valeur biologique de manière significative, sans lui permettre toutefois d'égaler celle du lait.

Tableau II

Résultats expérimentaux

Régimes et Rats	N ingéré		N fécal		N urinaire		C. U. D.	V. B.
	Période sans protéines	Période avec protéines	Période sans protéines	Période avec protéines	Période sans protéines	Période avec protéines		
	mg	mg	mg	mg	mg	mg		
I. — *Lait:*								
1	11,1	143,1	14,8	21,2	29,1	52,5	95,1	81,4
2	7,2	127,6	9,2	26,0	19,6	34,7	86,0	85,4
3	7,6	126,7	8,4	19,0	17,7	37,2	91,1	82,0
4	6,0	120,1	9,1	17,5	17,6	35,0	92,6	83,5
5	6,7	131,6	9,5	25,4	18,6	36,0	87,3	84,0
6	8,3	146,7	10,6	18,0	26,3	50,6	94,5	81,3
7	4,9	114,8	16,6	26,0	13,2	28,3	91,4	84,9
8	4,6	152,1	9,1	19,5	17,4	35,8	93,0	86,5
9	5,0	157,5	6,9	19,4	9,2	28,6	91,8	86,1
Moyennes							*91,4*	*84,0*
II. — *Caillé égoutté:*								
10	12,8	143,9	16,2	23,4	23,1	65,6	94,5	65,8
11	9,6	151,0	13,3	16,3	20,2	65,3	97,8	67,4
12	8,1	125,8	13,1	16,5	20,6	59,6	97,1	65,8
13	6,6	134,0	8,5	13,0	21,2	61,5	96,4	67,1
14	6,1	124,2	8,1	11,6	15,1	56,7	97,0	63,7
15	7,2	143,8	13,2	17,6	26,8	80,6	97,7	59,3
16	5,4	142,4	9,1	17,1	21,2	65,6	94,1	65,6
17	4,3	139,3	7,4	20,9	18,2	72,2	90,0	55,5
18	4,3	138,7	7,0	17,2	14,6	58,2	92,4	64,9
Moyennes							*95,0*	*63,9*
III. — *Caillé égoutté + lactosérum:*								
19	10,6	159,2	14,9	17,3	22,0	62,8	98,3	72,0
20	7,4	134,8	8,2	12,7	23,8	58,9	96,4	71,4
21	8,2	152,4	10,2	14,5	19,9	53,4	97,0	76,0
22	8,4	155,2	10,0	14,7	21,8	56,8	96,8	76,0
23	6,7	149,0	15,0	18,0	17,2	45,8	95,4	78,9
24	5,8	151,3	11,3	22,2	19,0	58,6	92,5	70,8
25	5,7	137,6	8,9	14,2	20,2	47,6	95,9	78,3
26	3,9	142,2	5,7	13,8	15,7	54,9	94,1	69,9
Moyennes							*95,2*	*74,2*
IV. — *Camembert n° 1:*								
27	7,5	155,1	11,1	17,7	19,9	78,7	95,5	58,5
28	6,5	109,8	8,7	12,1	16,9	54,2	96,7	62,6
29	5,8	114,8	8,0	14,4	16,2	61,2	95,8	56,1
30	6,9	118,7	11,2	15,1	15,4	58,5	96,5	60,0
31	6,7	121,4	9,5	16,8	14,5	60,9	93,6	56,8
Moyennes							*95,6*	*58,8*
V. — *Camembert n° 2:*								
32	5,0	119,9	9,4	11,6	23,3	63,0	98,1	64,7
33	5,7	133,8	13,3	17,4	24,7	64,4	96,8	67,9
34	4,3	120,2	8,5	13,5	16,8	51,8	95,7	68,4
35	4,3	97,5	10,4	14,3	16,3	49,0	95,8	63,4
Moyennes							*96,6*	*66,1*

IV. — DISCUSSION DES RÉSULTATS

Des résultats précédents, il semble logique de conclure qu'au moins dans certains cas, les modifications des propriétés biologiques des protides des fromages par rapport à celles du lait, peuvent se produire au cours des premiers stades de la fabrication : caillage du lait, égouttage du caillé.

Dans notre expérience, le fait même du caillage, indépendamment de l'égouttage du caillé, a relevé le coefficient d'utilisation digestive des protides du lait jusqu'à une valeur égale pratiquement à celle qui caractérise les protides des camemberts utilisés.

En ce qui concerne les modifications de la valeur biologique, leur origine est plus complexe. Dans notre expérience, ces modifications paraissent dues à un double phénomène :

— comme on pouvait le prévoir, en se reportant aux travaux cités dans l'introduction de ce mémoire, elles seraient dues en partie à l'égouttage du caillé qui entraîne l'élimination de protéines dont la qualité biologique est probablement supérieure chez le Rat à celle de la caséine ;

— mais ces mêmes modifications résulteraient également du caillage lui-même, sans qu'on puisse dire d'ailleurs si la responsabilité en revient à l'abaissement du pH ou à l'action de la présure.

De plus, on remarquera que la valeur biologique des protides du caillé égoutté est tout à fait comparable à celle des protides des deux fromages utilisés.

Sans doute, les conditions dans lesquelles le caillé étudié a été obtenu et égoutté, ne reproduisent-elles pas exactement celles que l'on rencontre dans l'industrie fromagère. Il n'en est pas moins vrai que, dans nos expériences, l'identité des coefficients d'utilisation digestive des protides du caillé égoutté et du Camembert ainsi que celle de leurs valeurs biologiques, permet de se demander si, dans le cas de certains fromages, les conditions du caillage et de l'égouttage ne suffisent pas à expliquer les modifications des propriétés biologiques des protides des produits obtenus, la maturation n'exerçant qu'une influence faible ou même nulle sur ces propriétés. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons l'intention de comparer les propriétés biologiques du lait et de caillés obtenus en fromagerie à partir de ce lait.

V. — CONCLUSION

En entreprenant cette étude expérimentale, notre but était de rechercher si l'élimination des protéines solubles du lait au cours de l'égouttage du caillé peut rendre compte, au moins pour une part, de la supériorité des protides des fromages sur ceux du lait, du point de vue de

la valeur biologique. Cependant, il nous a paru intéressant, au cours de la même expérience, de rechercher également si les propriétés biologiques des protides sont modifiées par le caillage lui-même.

Dans les conditions où nous nous sommes placés, nous avons constaté que le caillage améliorait légèrement l'utilisation digestive des protides du lait, mais qu'il abaissait leur valeur biologique. L'égouttage du caillé ne modifie pas l'utilisation digestive, mais entraîne une nouvelle diminution de la valeur biologique, diminution qui peut s'expliquer par l'élimination des protéines solubles du lait : on sait en effet que, chez le Rat, la valeur biologique de la lactalbumine et de la lactoglobuline est supérieure à celle de la caséine.

Au total, il est intéressant de constater que l'utilisation digestive et la valeur biologique des protides du caillé étudié sont pratiquement égales à celles des protides du Camembert. Il est donc permis de se demander si, dans le cas de certains fromages, les conditions du caillage et de l'égouttage du caillé ne suffisent pas à rendre compte des propriétés biologiques de leurs protides, la maturation n'exerçant sur ces propriétés qu'une influence faible ou même nulle.

Nous avons l'intention d'entreprendre de nouvelles recherches pour vérifier cette hypothèse.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Edelstein (F.) et Langstein (L.). — Das Eiweissproblem in Säuglingsalter. Experimentelle Untersuchungen über die Wertigkeit der Milcheiweisskörper für das Wachstum. *Ztschr. für Kinderheilk*, 1919, **20**, 112.

(2) Lewis (H. B.). — Influence of small Amounts of Cystine on Balance of N in Dogs maintained on low-protein Diet. *Journ. Biol. Chem.*, 1917, **31**, 363.

(3) Mitchell (H. H.). — The biological Value of Proteins at different Levels of Intake. *Journ. Biol. Chem.*, 1924, **58**, 905.

(4) Mueller (A. J.) et Cox (W. M.). — Comparative Nutritive Value of Casein and Lactalbumin for Man. *Journ. Nutr.*, 1947, **34**, 285.

(5) Osborne (T. B.) et Mendel (L. B.). — The comparative Value of certain Proteins in Growth and the Problem of the Protein Minimum. — *Journ. Biol. Chem.*, 1915, **20**, 351.

(6) Randoin (L.) et Causeret (J.). — Recherches préliminaires sur l'utilisation digestive et sur la valeur biologique des protides de diverses espèces de fromages. *Ann. de Technologie Agricole*, 1956, **4**, 541.

RECHERCHES PRÉLIMINAIRES SUR L'UTILISATION DIGESTIVE ET SUR LA VALEUR BIOLOGIQUE DES PROTIDES DE DIVERSES ESPÈCES DE FROMAGES

PAR

Lucie RANDOIN et Jean CAUSERET
Laboratoire de Physiologie de la Nutrition, Paris.

PLAN DU MÉMOIRE

I. — **Introduction.**

II. — **Techniques expérimentales** :
1° Conduite des études métaboliques.
2° Régimes alimentaires.
3° Caractéristiques du lait et des fromages utilisés.
4° Détermination des ingesta et des excreta.

III. — **Résultats obtenus.**

IV. — **Discussion des résultats** :
1° Utilisation digestive des protides des fromages.
2° Valeur biologique des protides des fromages.

V. — **Conclusion.**

Bibliographie.

I. — INTRODUCTION

Si les transformations physico-chimiques de la caséine au cours de la maturation des fromages ont fait l'objet de nombreuses recherches expérimentales, il n'en est pas de même en ce qui concerne la digestibilité et la valeur biologique de leurs constituants protéiques.

Nous avons seulement connaissance, sur ce point, d'un très petit nombre de travaux dont les résultats sont d'ailleurs contradictoires.

Ainsi, pour BEADLES et Collab. (1), la digestibilité des matières azotées du Cheddar, du Gruyère, du Limbourg et du Roquefort serait du même ordre de grandeur que celle des protéines du lait ; quant à leur valeur biologique, elle serait inchangée dans le cas du Gruyère, mais légèrement abaissée dans celui du Limbourg. Pour les chercheurs

de l'Université de Reading (9), la digestibilité et la valeur biologique des protéines du Cheddar, du Cheshire et du Stilton seraient pratiquement identiques à celles des protéines du lait utilisé pour leur fabrication. Au contraire, d'après MITCHELL (8), la valeur biologique des protéines du Gruyère atteindrait seulement 73 au lieu de 90 dans le cas des protéines du lait.

Nous avons donc cru utile de reprendre l'étude d'un problème d'autant plus important que les produits laitiers, et en particulier les fromages, couvrent en France une part importante des besoins protéiques de l'organisme : avec plus de 8 kg par tête d'habitant et par an, la consommation française de fromage est une des plus importantes dans le monde (10).

Nos recherches ont porté sur 9 fromages choisis de manière que les principaux types de fabrication de l'industrie fromagère soient représentés. Parmi les espèces étudiées, figuraient en effet :

— deux espèces de fromages à pâte molle, obtenus à partir d'un caillé à égouttage spontané : le Camembert et le Brie ;

— deux espèces de fromages à pâte molle, obtenus à partir d'un caillé à égouttage accéléré : le Pont-l'Evêque et le Munster ;

— deux espèces de fromages à pâte pressée non cuite : le Saint-Paulin et le Cantal ;

— deux espèces de fromages à pâte pressée cuite : le Gruyère et le Parmesan ;

— une espèce de fromage à moisissures internes : le Bleu d'Auvergne.

II. — TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

1° Conduite des études métaboliques

Les études métaboliques ont été effectuées en deux temps.

Dans une première période (*période sans azote*), nous avons soumis 51 jeunes rats blancs de sexe mâle, pesant de 40 à 50 g, à un régime ternaire, en vue de déterminer les quantités d'azote endogène éliminées par voie fécale et par voie urinaire. Cette période a duré 9 jours, mais la détermination des ingesta et la récolte des excreta n'ont commencé que le quatrième : elles ont donc été poursuivies pendant 6 jours au total.

Dans une seconde période (*période protéique*), les animaux, répartis préalablement en 11 lots de 3 à 5 sujets, ont été soumis à des régimes contenant tous la même quantité d'azote (1,6 p. 100, soit environ 10 p. 100 de protéines), fournie sous forme de lait en poudre (lots I et II) ou de divers fromages (lots III à XI).

Les animaux du lot II ont tous reçu une ration alimentaire res-

treinte, de manière que leur consommation de nourriture soit comparable à celle des animaux qui recevaient du fromage (lots III à XI) : l'appétit de ces derniers était en effet moins grand que celui des sujets du lot I.

La période protéique a duré 15 jours, le « bilan » proprement dit ne portant que sur sa seconde moitié (du huitième au quinzième jour inclus) : pour commencer la détermination des ingesta et la récolte des excreta, il a été en effet nécessaire d'attendre que le retard de croissance dû à l'alimentation sans azote de la première période soit comblé.

2° Régimes alimentaires

Le *régime ternaire* de la première période a été obtenu par cuisson de deux parties du mélange suivant avec une partie d'eau :

Amidon de froment	50
Saccharose	32
Huile d'arachide	12
Mélange salin de HUBBEL, MENDEL et WAKEMAN	4
Agar-agar	2

Les vitamines hydrosolubles ont été introduites dans le régime aux doses suivantes (par kg de régime) :

Thiamine	2 mg
Riboflavine	3 mg
Pyridoxine	2,5 mg
Acide nicotinique	50 mg
Pantothénate de calcium	10 mg
Vitamine K (hydrosoluble)	1 mg

Quant aux vitamines liposolubles, elles ont été fournies sous forme d'huile de foie de morue (1) incorporée à la dose de 1 p. 100 dans l'huile d'arachide.

Théoriquement dépourvu d'azote, ce régime en contenait cependant 94 mg p. 100 g sec, apporté notamment par l'amidon et l'agar-agar : de ce fait, la détermination de l'excrétion azotée endogène a pu être faussée légèrement par excès. Nous en avons tenu compte pour les calculs de valeurs biologiques.

Les animaux ont reçu comme boisson de l'eau distillée.

La composition des *régimes protéiques* utilisés dans la seconde période, est mentionnée dans le *tableau I*.

Ainsi que nous l'avons déjà souligné, tous ces régimes contenaient des quantités de lait ou de fromage calculées de manière que leur taux protéique soit le même (environ 10 p. 100). Mais nous avons également ajusté les taux lipidiques et glucidiques de ces régimes à des valeurs constantes, en y introduisant des quantités d'huile et de sacharose variables.

(1) Titrant 2 000 U. I. de vitamine A et 500 U. I. de vitamine D par centimètre cube.

TABLEAU I

Composition des régimes d'expérience

Régimes	Lait écrémé en poudre	Fromage	Huile d'arachide (1)	Amidon	Saccharose	Mélange salin spécial	Agar-agar
I et II. Lait	24	—	12	40	22	0,0075	2
III. Camembert	—	38	3	40	32	0,0075	2
IV. Brie	—	45,9	2	40	30	0,0075	2
V. Pont-l'Évêque	—	26,5	7	40	32	0,0075	2
VI. Munster	—	37,2	4	40	32	0,0075	2
VII. Saint-Paulin	—	38,2	2	40	30	0,0075	2
VIII. Cantal	—	33	2	40	32	0,0075	2
IX. Gruyère	—	27	4	40	33	0,0075	2
X. Parmesan	—	28	4	40	33	0,0075	2
XI. Bleu d'Auvergne	—	39	2	40	31	0,0075	2

(1) Additionnée de 1 p. 100 d'huile de foie de morue titrant 2 000 U.I. de vitamine A et 500 U.I. de vitamine D par centimètre cube.

Nous signalons également que la composition du mélange salin employé était différente de celle du mélange de la première période : nous avons simplement cherché à compléter l'apport minéral du lait ou des fromages en ce qui concerne les oligo-éléments. Le mélange salin spécialement préparé à cet effet dérivait de celui de HUBBEL, MENDEL et WAKEMAN. En voici la composition :

Iodure de potassium	3,2
Alun de potassium	6,8
Sulfate de manganèse	14,0
Sulfate de cuivre	36,0
Fluorure de sodium	40,0

Les vitamines hydrosolubles et liposolubles ont été administrées de la même manière que précédemment.

Les onze régimes ont été distribués aux animaux sous forme de pâtes obtenues par cuisson d'un mélange de lait (ou de fromage écrasé) et des autres constituants de ces régimes, avec un volume d'eau convenable. Le taux d'hydratation des régimes finis était de l'ordre de 750 g d'eau pour 1 kg sec.

Comme au cours de la période précédente, les animaux ont reçu de l'eau distillée comme boisson.

3° Caractéristiques du lait et des fromages utilisés

Le lait introduit dans les régimes des lots I et II était un lait en poudre écrémé contenant 6,7 p. 100 d'azote et 2 p. 100 de matières grasses. Le séchage de ce lait avait été réalisé par le procédé du brouillard qui, d'après HENRY et collab. (4), et d'après nos constatations antérieures, ne modifie pas la valeur biologique des protéines du lait.

Tous les échantillons de fromage provenaient du commerce. Les régimes ayant été préparés une seule fois pour toute la durée de la période protéique et conservés ensuite à basse température, un seul échantillon de chaque fromage a donc servi à nos recherches.

La teneur en azote total de ces fromages était la suivante :

	Teneur en azote (p. 100)
Camembert	4,10
Brie	3,42
Pont-l'Évêque	5,86
Munster	4,18
Saint-Paulin	4,11
Cantal	4,76
Gruyère	5,70
Parmesan	5,60
Bleu d'Auvergne	4,02

C'est en nous basant sur ces chiffres que nous avons calculé les quantités de fromage indiquées dans le *tableau I*.

4° Détermination des ingesta et des excreta

Pour la détermination des ingesta et la récolte des excreta, nous avons utilisé un dispositif expérimental assez voisin de celui qu'utilise Chevillard (3).

Chaque animal est placé dans une cage qui supporte deux mangeoires extérieures dont la forme et la disposition interdisent le gaspillage. La cage est placée au-dessus d'un entonnoir dont la tige, sectionnée à quelques centimètres du sommet, porte une petite poire de verre. Le diamètre maximum de la poire est un peu supérieur à celui de la tige de l'entonnoir ; sa pointe, dirigée vers le bas, pénètre dans un flacon où l'urine est collectée. Le flacon à urine est lui-même placé dans un vase à précipitation au fond duquel les crottes viennent tomber après avoir ricoché sur la poire ([1]).

Pour déterminer les quantités d'azote ingérées, il suffit de doser cet élément dans les régimes et de peser quotidiennement, par différence, les quantités de nourriture consommées.

La détermination des quantités d'azote excrétées se fait par analyse :

— des fèces préalablement déshydratées à l'étuve à 100° et finement moulues au moulin turc ;

— de l'urine, additionnée des eaux de rinçage du dispositif expérimental.

Tous les dosages d'azote ont été effectués, après minéralisation sulfurique, par la méthode de Kjeldahl.

([1]) On trouvera une description plus complète et un schéma de ce dispositif dans (2).

III. — RÉSULTATS OBTENUS

Tous les animaux se sont comportés normalement pendant la durée de l'expérience. L'évolution pondérale moyenne a été la même pour les lots II à XI, celle des sujets du lot I étant plus rapide, puisque leur consommation de nourriture était plus importante.

Le *coefficient de digestibilité* (C. U. D.) des protéines du lait et des fromages a été calculé par la formule de P. LELU (5) :

$$\text{C. U. D.} = \frac{\text{(N ingéré pér. prot. — N ingéré pér. sans prot.)} - \text{(N fécal pér. prot. — N fécal pér. sans prot.)}}{\text{N ingéré pér. prot. — N ingéré pér. sans prot.}} \times 100.$$

Cette formule, qui dérive de celle de MENDEL et FINE (7), permet tout à la fois de tenir compte de l'existence d'une excrétion fécale d'azote métabolique et de la présence inévitable de quantités de matières azotées non négligeables dans le régime ternaire.

Pour la détermination des valeurs biologiques (V. B.), nous avons accordé la préférence à la formule de MARTIN et ROBISON (6) :

$$\text{V. B.} = \frac{\text{Bilan azoté pér. prot. — Bilan azoté pér. sans prot.}}{\text{(N ingéré pér. prot. — N fécal pér. prot.)} - \text{(N ingéré pér. sans prot. — N fécal pér. sans prot.)}} \times 100.$$

Cette formule permet de tenir compte de l'existence d'une excrétion fécale et urinaire d'azote métabolique, ainsi que de la présence de petites quantités de matières azotées dans le régime ternaire.

Les résultats obtenus sont réunis dans le *tableau II*.

IV. — DISCUSSION DES RÉSULTATS

1° Utilisation digestive des protides des fromages

L'examen des résultats réunis dans le *tableau II* montre que, pour tous les fromages étudiés, le coefficient de digestibilité des protéines est plus élevé que pour le lait en poudre : chez les animaux des lots III à XI, il atteint de 96,1 à 97,7 au lieu de 90,4 et 91,4 chez ceux des lots I et II.

Les différences d'utilisation digestive entre les protéines du lait en poudre et les protéines des fromages sont significatives, mais il n'en est pas de même en ce qui concerne les différences entre fromages : en fait, pour toutes les espèces étudiées, l'absorption intestinale porte sur une fraction toujours trés élevée de l'azote.

Tableau II

Résultats expérimentaux.

Régimes et Rats	N ingéré		N fécal		N urinaire		C. U. D.	V.B.
	Période sans protéines	Période avec protéines	Période sans protéines	Période avec protéines	Période sans protéines	Période avec protéines		
Lait	mg	mg	mg	mg	mg	mg		
I. — *Lait (ad libitum) :*								
1	4,60	132,50	5,93	18,07	10,73	21,00	90,5	91,1
2	5,54	145,63	6,35	19,77	10,50	27,60	90,4	86,5
3	4,65	137,60	8,59	21,16	12,83	24,15	90,5	90,5
4	4,60	132,50	10,13	20,83	15,40	25,90	91,6	91,0
5	4,06	122,40	6,02	18,40	11,43	21,70	89,5	90,3
Moyennes							*90,5* ± *0,2*	*89,9* ± *0,9*
II. — *Lait (restriction) :*								
6	5,42	72,21	7,60	12,10	19,56	23,15	93,3	94,2
7	4,35	71,30	6,98	14,53	13,11	18,59	88,7	90,8
8	4,92	73,44	8,12	13,27	12,45	20,78	92,5	86,8
9	4,51	71,53	6,80	13,44	11,57	21,90	90,1	82,9
10	5,60	74,49	7,00	10,74	13,70	24,41	92,6	83,2
Moyennes							*91,4* ± *0,9*	*87,6* ± *2,2*
Fromages à pâte molle (caillé à égouttage spontané) :								
III. — *Camembert :*								
11	5,03	107,20	7,28	8,87	11,70	47,07	98,4	64,8
12	4,86	105,95	9,10	11,44	13,50	47,95	97,7	65,6
13	4,16	89,50	7,93	11,41	10,40	44,10	95,9	58,8
14	5,14	97,20	7,56	10,29	14,23	45,50	97,0	64,9
15	4,61	99,80	6,63	10,36	14,00	45,10	96,1	65,9
Moyennes							*97,0* ± *0,5*	*64,0* ± *1,3*
IV. — *Brie :*								
16	6,40	84,85	14,28	16,14	16,07	49,04	97,6	56,9
17	6,30	104,92	10,50	13,05	14,69	50,81	97,4	62,4
18	6,11	128,88	10,62	14,45	18,65	62,51	96,9	63,1
19	5,29	110,46	10,29	13,05	16,80	38,00	97,4	79,3
Moyennes							*97,3* ± *0,1*	*65,4* ± *4,8*
Fromages à pâte molle (caillé à égouttage accéléré) :								
V. — *Pont-l'Évêque :*								
20	5,70	87,67	9,65	12,19	14,96	55,82	96,9	48,6
21	6,35	77,68	12,78	14,74	20,53	43,75	97,2	66,5
22	6,76	62,44	12,72	13,77	18,20	25,12	98,1	87,3
23	8,25	97,81	11,20	17,08	23,80	57,75	93,3	59,4
24	7,47	96,46	10,90	14,83	19,13	43,75	95,6	71,0
Moyennes							*96,2* ± *0,8*	*66,5* ± *6,5*
VI. — *Munster :*								
25	6,41	74,92	11,62	14,09	15,68	45,06	96,4	51,0
26	7,06	111,53	11,20	14,19	25,66	61,69	97,1	64,5
27	6,00	86,02	13,87	17,56	20,53	53,99	95,4	56,2
28	6,52	88,53	9,93	13,12	21,47	55,69	96,1	56,6
29	6,50	84,80	12,27	13,28	19,13	55,90	98,7	52,4
Moyennes							*96,7* ± *0,6*	*56,1* ± *2,3*

TABLEAU II *(suite)*

Résultats expérimentaux.

Régimes et Rats	N ingéré		N fécal		N urinaire		C. U. D.	V. B.
	Période sans protéines	Période avec protéines	Période sans protéines	Période avec protéines	Période sans protéines	Période avec protéines		
Fromages à pâte pressée non cuite :								
VII. — *Saint-Paulin :*								
30	6,73	84,85	10,29	13,88	19,49	47,67	95,4	62,2
31	5,05	77,66	11,67	13,78	28,84	54,77	97,1	63,2
32	7,24	92,33	10,53	12,76	17,36	53,05	97,4	56,9
Moyennes							*96,6* ± *0,6*	*60,8* ± *2,0*
VIII. — *Cantal :*								
33	7,55	63,11	9,13	10,42	19,65	54,34	97,7	35,9
34	6,70	60,93	8,58	10,24	9,80	43,12	96,9	36,6
35	6,50	70,13	10,08	10,75	14,47	47,32	98,9	47,8
36	6,58	59,88	7,70	9,52	16,57	40,88	96,6	52,8
37	6,40	67,74	10,22	11,17	10,26	54,88	98,4	26,1
Moyennes							*97,7* ± *0,4*	*39,8* ± *4,7*
Fromages à pâte pressée cuite :								
IX. — *Gruyère :*								
38	5,08	73,86	6,52	8,47	12,83	27,65	97,2	77,8
39	4,58	65,76	6,39	8,71	13,53	28,00	96,2	75,4
40	4,18	64,29	5,88	7,63	7,23	28,35	97,1	80,9
41	5,63	72,78	7,19	8,71	14,70	21,00	97,7	90,4
Moyennes							*97,0* ± *0,4*	*81,1* ± *3,3*
X. — *Parmesan :*								
42	9,14	60,45	8,71	10,59	18,52	41,00	96,3	54,5
43	6,88	74,19	9,80	10,42	14,79	40,21	99,1	61,9
44	7,25	100,88	11,67	12,76	16,89	45,80	98,8	68,7
45	7,35	67,91	9,75	11,16	19,36	40,04	97,7	65,0
46	5,87	86,33	11,43	15,29	18,01	44,80	95,2	65,0
Moyennes							*97,4* ± *0,7*	*63,0* ± *2,4*
Fromage à moisissures internes :								
XI. — *Bleu d'Auvergne :*								
47	8,19	83,62	10,50	11,66	22,54	47,60	98,5	66,2
48	6,98	77,43	9,47	10,44	20,67	39,20	98,6	73,3
49	6,48	92,91	11,11	14,59	17,73	49,84	96,0	61,3
50	7,14	70,50	10,45	17,20	15,40	31,19	89,3	72,1
51	6,37	86,23	9,50	11,02	15,96	56,60	98,1	48,1
Moyennes							*96,1* ± *1,8*	*64,2* ± *4,6*

On pourra objecter que la comparaison a été faite entre fromages et lait *en poudre*. Mais, nous avons déjà rappelé que le séchage du lait par le procédé du brouillard ne modifie pas son utilisation digestive. Ayant eu l'occasion de comparer, dans d'autres séries d'expériences, l'utilisation digestive des protéines de l'échantillon de lait sec utilisé et celle d'un lait en nature, nous avons obtenu des valeurs pratiquement identiques.

2° Valeur biologique des protides des fromages

Si, en ce qui concerne l'utilisation digestive, la comparaison lait-fromages est tout en faveur de ces derniers, il n'en est pas de même en ce qui concerne la valeur biologique des protéines : alors que celle-ci atteint 89,9 et 87,6 pour les lots I et II, elle est comprise entre 39,8 et 81,1 pour les lots III à XI.

La grande majorité des valeurs moyennes se groupe aux alentours de 60-65. Seuls, les échantillons de Gruyère et de Cantal se distinguent,

— le premier par une valeur biologique très élevée, presque égale à celle du lait ;

— le second, par une valeur biologique plus basse.

Cependant, de tous ces chiffres, on ne peut tirer aucune conclusion relative à l'influence des techniques de fabrication sur l'utilisation physiologique de l'azote des fromages. En effet, si le Camenbert et le Brie, qui appartiennent tous deux au groupe des fromages à pâte molle avec égouttage spontané du caillé, ont des valeurs biologiques comparables, il existe par contre des différences considérables entre le Saint-Paulin et le Cantal (tous deux fromages à pâte pressée non cuite), ainsi qu'entre le Gruyère et le Parmesan (tous deux fromages à pâte pressée cuite).

Ici, comme dans le cas de l'utilisation digestive, la comparaison lait en poudre-fromage est valable, puisque le séchage du lait par le procédé du brouillard ne modifie pas sensiblement la valeur biologique de ses protéines. En comparant de ce point de vue l'échantillon de lait sec utilisé et un lait en nature, nous avons d'ailleurs obtenu, dans les mêmes conditions expérimentales, des valeurs identiques.

Nous ne pouvons fournir actuellement aucune explication entièrement satisfaisante de l'abaissement général de la valeur biologique des protéines des fromages par rapport à celle des protéines du lait. Cet abaissement est-il dû simplement à la disparition de la lactalbumine au cours de l'égouttage du caillé ? Un ou plusieurs des acides aminés sont-ils consommés par les divers microorganismes qui assurent la maturation des fromages ou rendus « indisponibles » au cours de cette maturation ? Ou bien faut-il incriminer, au moins pour une part, les modifications de l'équilibre minéral et vitaminique des fromages par rapport à celui du lait ?

Pour le savoir, de nouvelles recherches seraient nécessaires, recherches qui pourraient comporter éventuellement :

— des déterminations de valeurs biologiques sur des caillés de fromagerie ;

— des dosages comparatifs d'acides aminés dans les protéines du lait et des divers fromages ;

— des essais de supplémentation des protéines des fromages au moyen de divers acides aminés indispensables ;

— des déterminations de valeurs biologiques sur des fromages rééquilibrés par addition des matières minérales du lait ;

— une étude de l'évolution de la valeur biologique des fromages aux divers stades de leur fabrication.

V. — CONCLUSION

Une série de bilans azotés effectués sur de jeunes rats a permis de comparer l'utilisation digestive et la valeur biologique des protides du lait et de neuf espèces de fromages représentant les principaux types de fabrication.

Il est apparu que l'utilisation digestive des protides de tous les fromages étudiés est plus élevée que celle des protides du lait (en moyenne 96-98 p. 100 au lieu de 90-91 p. 100).

Inversement, la valeur biologique des protides des fromages est moins élevée que celle des protides du lait. Elle est le plus souvent de l'ordre de 60-65, au lieu de 85-90 pour le lait. Cependant, dans des groupes réunissant des fromages dont les procédés de fabrication sont comparables, on observe souvent des différences considérables.

Il semble que l'on puisse mettre l'amélioration de l'utilisation digestive en relation avec la dégradation des protides du caillé au cours de la maturation des fromages. Par contre, l'abaissement de la valeur biologique des protides des fromages ne peut être expliquée entièrement.

Nos recherches ont porté sur un seul échantillon de chaque fromage : il serait donc prématuré et abusif d'en généraliser les conclusions, et plus encore les résultats chiffrés. Cependant, le fait que, pour les neuf espèces étudiées, sans aucune exception, le *sens* des résultats obtenus est le même (augmentation du coefficient d'utilisation digestive, abaissement de la valeur biologique), nous paraît justifier la publication de cette étude, qui sera d'ailleurs reprise de manière systématique sur des échantillons de fromages plus nombreux et d'origine mieux connue.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Beadles (J. R.), Quisenberry (J. H.), Nakamura (F. I.) et Mitchell (H. H.). — Effect of the ripening process of cheese on the nutritive value of milk curd. *Journ. Agric. Res.*, 1933, **47**, 947.

(2) Causeret (J.). — Recherches sur l'utilisation physiologique du calcium au cours de la croissance chez le Rat. Nouveaux aspects du rôle biologique de la vitamine D. *Ann. de Zootechnie*, 1954, **3**, 271.

(3) Chevillard (L.). — Communication personnelle.
(4) Henry (K. M.), Houston (J.), Kon (S. K.) et Osborne (L. W.). — Effects of commercial drying and evaporating on the nutritive properties of milk. *Journ. Dairy Res.*, 1939, **10**, 273.
(5) Lelu (P.). — L'utilisation digestive comparée des matières albuminoïdes chez diverses espèces animales. *Arch. Int. Physiol.*, 1934, **39**, 34.
(6) Martin (C.) et Robison (J.). — Minimum N expenditure of man and the biological value of various proteins for human nutrition. *Biochem. Journ.*, 1922, **16**, 407.
(7) Mendel (L. B.) et Fine (M. S.). — Studies in nutrition. II. The utilization of the proteins of barley. *Journ. Biol. Chem.*, 1911, **10**, 338.
(8) Mitchell (H. H.). — Biological utilization of proteins in Sahyun, Proteins and aminoacids in nutrition, New-York, Reinhold éd., 1948.
(9) Univ. of Reading. — National Institute for Research in Dairying, Rep. for 1941, 1942, 1945.
(10) Veisseyre (R.). — Contribution à l'étude de la consommation du lait et des produits laitiers en France. 1 vol. publié par le Bulletin Technique d'Information des Ingénieurs des Services Agricoles, Ministère de l'Agriculture, 1954.

LA CONSERVATION PAR DIVERS ANTISEPTIQUES DES ÉCHANTILLONS DE LAIT DESTINÉS AUX ANALYSES

PAR

Marie BEJAMBES, G. MOCQUOT et Paulette PAUTHE

Station centrale de Microbiologie et Recherches laitières, Jouy-en-Josas

---

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Introduction.

II. — Technique expérimentale.

A. — Examens bactériologiques.
B. — Analyses chimiques.

III. — Résultats.

A. — Lait sans antiseptique (lait témoin).
B. — Examens bactériologiques des laits additionnés d'antiseptiques.
a) Observation préliminaire.
b) Microbes aérobies.
c) Microbes se développent en anaérobiose.
C. — Analyses chimiques des laits additionnés d'antiseptiques.
a) lait additionné de bichromate de potassium,
b) lait additionné de formol et de trioxyméthylène,
c) lait additionné de merfen,
d) évolution de l'acidité des laits additionnés d'antiseptiques,
e) protéolyse des laits additionnés d'antiseptiques.

IV. — Conclusion.

I. — INTRODUCTION

Les échantillons de lait destinés aux expertises chimiques officielles (notamment dans le cas où l'on soupçonne la fraude par mouillage ou écrémage), sont additionnés d'antiseptiques dont le rôle est d'assurer la conservation du produit depuis le moment du prélèvement jusqu'à celui de l'analyse. L'antiseptique le plus employé actuellement en France est le bichromate de potassium à la dose de 1 g par litre de lait. Or, l'expérience a montré que son action n'est pas toujours suffisante :

les échantillons présentent trop souvent, au moment de l'analyse, les signes d'une altération plus ou moins avancée.

Dans ces conditions, l'analyse ne permet pas de se faire une idée exacte de la composition qu'avait le lait lors de son prélèvement et il s'ensuit que les conclusions de l'expert, s'il peut en formuler, risquent d'être incomplètes et même, dans certains cas, erronées.

L'emploi du bichromate a toujours été l'objet de vives critiques. Dès 1912, ROCQUES (1) avait constaté que son action n'est efficace que si le lait traité n'est pas acide. Sinon, l'acide lactique réduisant l'acide chromique, véritable agent de la conservation, les bactéries ne sont plus entravées dans leur développement.

KLING, GELIN et LASSIEUR, (2) d'une part, MAGNIER de la SOURCE (3) d'autre part, ont attiré l'attention sur le mauvais état des laits ainsi traités. HINARD (4) a étudié la répercussion de l'altération de ces laits sur les résultats de l'analyse. A son avis, l'addition de bichromate ne fait que retarder le développement microbien. Il estime également qu'il agit plus énergiquement sur les ferments lactiques que sur les ferments protéolytiques, mais que, suivant les circonstances, cette action sélective se manifeste plus ou moins activement.

L'action de l'antiseptique étant de courte durée, on pouvait envisager, lorsque son effet avait cessé de s'exercer pleinement, de faire agir un nouveau produit. C'est en partant de cette conception que FILAUDEAU (5), suivant une idée de VITOUX, a proposé l'emploi du formol et du trioxyméthylène. LETOURNEUR, HUGON et VALIN (6), étudiant ce procédé, ont conclu de façon formelle en sa faveur. Il est actuellement utilisé dans un certain nombre de services officiels.

D'autres antiseptiques ont été proposés : DENIGES (7) a conservé en parfait état pendant 10 ans des échantillons de lait additionnés de 1 p. 100 d'une solution de phénol contenant 50 g de phénol dans 10 ml d'alcool. On a reproché à cette méthode d'opérer une dilution du lait. FONZES-DIACON et LAFORCE (8) ont expérimenté un mélange à parties égales de bichromate et de trioxyméthylène.

Enfin, plus récemment, VOIRET (9) a préconisé l'emploi de l'acide salicylique en solution amylique saturée (1 à 2 ml dans 200 ml de lait). A l'action de l'antiseptique il ajoute celle de la chaleur : les échantillons traités sont maintenus 6 à 12 heures à la température de 70°.

Il nous a paru intéressant de comparer l'action bactéricide de quelques antiseptiques en suivant l'évolution de la flore microbienne d'échantillons de lait auxquels ces antiseptiques avaient été ajoutés. Nous avons étudié en même temps les variations de la teneur de ces échantillons en constituants glucidiques et azotés qui sont parmi les plus utiles à connaître pour la détection des fraudes, la fraude par mouillage en particulier.

Nos essais ont porté d'une part sur les antiseptiques utilisés par les

Services officiels aux doses où ils sont généralement employés : bichromate de potassium à 1 g par litre ; formol et trioxyméthylène : 0,6 m d'une solution commerciale de formol à 50 p. 100 et 4 pastilles de trioxyméthylène pesant chacune 0,400 g environ par litre de lait.

Et nous avons étudié d'autre part l'action d'un composé organique du mercure, le borate de phényl mercure (merfen), employé à la dose de 0,1 g par litre (20 ml d'une solution aqueuse à 0,5 p. 100 (1).

II. — TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE

Des échantillons de 2,5 litres de lait cru dont la teneur en germes dépassait en moyenne 10 millions par ml étaient additionnés de l'antiseptique étudié et introduits dans des flacons stériles. Ils étaient maintenus pendant toute la durée de l'expérience à 30°, température considérée comme la plus favorable au développement de la plupart des germes microbiens du lait.

Immédiatement avant et après l'addition de l'antiseptique, puis à des intervalles de temps variables suivant les cas, on prélevait aseptiquement dans les flacons ainsi incubés les quantités de lait nécessaires pour effectuer le dénombrement des germes et les analyses chimiques.

D'autre part, un « essai témoin » a porté sur du lait cru, sans antiseptique, placé à l'étuve à 30° pour lequel on a effectué les mêmes examens bactériologiques et chimiques que pour les laits additionnés d'antiseptiques.

A. — Examens bactériologiques

On a déterminé :

a) le nombre total de germes cultivant sur boite de Petri en milieu gélosé à base de lait digéré par la papaïne (GUITTONNEAU et CHEVALIER) (10).

b) le nombre de germes cultivant en gélose profonde sur le milieu de HIRSCH et GRINSTED (R. C. M.) (11). L'anaérobiose était réalisée suivant la technique indiquée par DORNER et al. (12).

B. — Analyses chimiques

Elles ont comporté :

a) La détermination de l'acidité, et, dans quelques cas, du pH.

b) Le dosage du lactose ; celui-ci a été dosé après hydrolyse totale. On sait en effet que l'action de certains microorganismes provoque rapidement une hydrolyse partielle du lactose, ce qui se traduit par une aug-

(1) Nous remercions Mme Ruiz à qui nous sommes redevables de l'échantillon de merfen qui nous a été nécessaire.

mentation du pouvoir réducteur et peut masquer la disparition par fermentation d'une quantité de lactose appréciable. Le dosage des sucres réducteurs après hydrolyse totale permet d'éliminer cette cause d'erreur. Nous avons adopté la technique préconisée par SAENZ LASCANO RUIZ (13). Les résultats sont exprimés en lactose hydraté.

c) Dosage des substances azotées.

Nous avons dosé l'azote total, l'azote du filtrat obtenu après précipitation de la caséine et l'azote non protéique suivant la méthode de ROWLAND (14).

III. — RÉSULTATS

A. — Lait sans antiseptique

Un lait contenant 6 000 germes par ml a été porté à 30° et les prélèvements ont été effectués immédiatement, puis 2 h 30 — 5 h — 7 h 30 plus tard. Jusqu'à ce moment, les modifications chimiques se sont révélées très faibles, malgré un développement important de la flore microbienne. Après un séjour de 17 h environ au frigorifique, à la température de 5°, le lait a été ramené à 30° et des prélèvements ont de nouveau été effectués jusqu'au moment où s'est manifesté un début de coagulation du lait.

On trouvera sur le tableau I les conditions de l'expérience et les résultats des analyses effectuées.

TABLEAU I

Lait cru sans antiseptique

Incubation		Acidité degrés Dornic	Lactose		N non protéique		Germes totaux (aérobies) par ml
Température	Durée		mg/ml	var. % (*a*)	mg/ml	var. % (*b*)	
+ 30°	0	20	47		0,32		6×10^3
	2 h 30	21	47		0,33		165×10^3
	5 h	21	47		0,33		$4\,800 \times 10^3$
	7 h 30	21	46,8	0,4	0,33		14×10^6
+ 5°	24 h	25	46,1	1,9	0,33		126×10^6
+ 30°	26 h 30	34	45,1	4,0	0,35	9,3	500×10^6
	29 h 15	73	41,7	11,2	0,40	25	750×10^6

(*a*) diminution en pourcentage de la valeur initiale
(*b*) augmentation en pourcentage de la valeur initiale.

B. — Examens bactériologiques des laits additionnés d'antiseptiques

a) Observation préliminaire

Le lait ou la dilution de lait ajouté au milieu gélosé au cours de la numération apporte, en même temps que les germes microbiens, une

quantité d'antiseptique proportionnelle au volume de lait ensemencé. Or cette dose d'antiseptique peut être suffisante pour inhiber le développement microbien sur le milieu de culture. Il convient donc tout d'abord de déterminer pour chaque antiseptique la « concentration-seuil » c'est-à-dire la concentration maxima dans le milieu gélosé au-dessus de laquelle l'antiseptique est susceptible d'exercer une action inhibitrice.

Le volume final de milieu ensemencé avec 1 ml de lait ou d'une dilution décimale de lait étant constant, on connaît sa concentration en antiseptique, soit A, A $\times$ 10-^{1}, A $\times$ 10^{-2}, etc...

Pour connaître la « concentration-seuil » il suffit de comparer à la numération des germes d'un lait cru sur le milieu gélosé choisi (témoin), la numération des germes du même lait sur le même milieu additionné d'antiseptique à dose telle que la concentration finale dans la gélose soit A pour une première série, A $\times$ 10-^{1} pour une deuxième, A $\times$ 10^{-2} pour une troisième, et ainsi de suite. On détermine ainsi les concentrations en antiseptique non inhibitrices. Parmi elles, la plus élevée est la « concentration-seuil ». Lorsqu'on la connaît il est facile de déterminer le volume de lait additionné d'antiseptique qui lui correspond.

On a noté sur le tableau II le résultat de cette expérience pour les antiseptiques essayés.

Dans le cas du formol et du trioxyméthylène, il nous était difficile de tenir compte à la fois de l'influence de ces deux corps. En effet, leur action ne se manifeste pas en même temps : celle du formol se produit dès l'addition au lait de cet antiseptique. Le trioxyméthylène n'agit au contraire qu'au fur et à mesure de sa dissolution dans le lait. L'expérience nous ayant montré qu'une destruction massive des germes se produisait dans les premiers jours qui suivent l'addition des antiseptiques au lait, donc pendant la période où l'action du formol est prédominante, nous nous sommes limités à la détermination de la « concentration-seuil » de ce corps.

TABLEAU II

Action inhibitrice des antiseptiques sur le développement des colonies microbiennes sur milieu gélosé

Antiseptiqne	Bichromate de K	Formol	Merfen
Concentration dans le lait	10^{-3}	3×10^{-4}	10^{-4}
« Concentration-seuil » dans la gélose...	10^{-5}	3×10^{-6}	10^{-7}
Quantité de lait correspondant à la « concentration-seuil »	0,1 ml	0,1 ml	0,01 ml

Au cours des numérations, nous n'avons donc pris en considération que les boîtes de Pétri ou les tubes ensemencés avec des quantités de lait égales ou inférieures à celles ainsi déterminées. Avec des quantités

de lait plus fortes, on doit admettre que le nombre de germes trouvé est inférieur au nombre de germes réellement présents dans le lait.

b) Microbes aérobies

L'examen bactériologique d'un certain nombre d'échantillons de lait additionnés d'antiseptiques nous a permis de faire les constatations suivantes :

Dans les laits bichromatés, le nombre de germes diminue rapidement, puis s'élève à nouveau. Ainsi, la teneur en germes d'un lait est passée de 2 milliards à mille par ml un jour après l'addition du bichromate. Puis les germes se sont multipliés à nouveau et 5 jours plus tard, le lait contenait 7 millions de microorganismes et était coagulé. L'action bactéricide du bichromate a donc été rapide mais de courte durée.

Le formol exerce une action plus prononcée. En effet, à partir du quatrième jour qui suit le traitement, les numérations microbiennes révèlent seulement la présence de quelques germes microbiens.

Quant au merfen, son action a été comparable à celle du formol bien qu'un peu plus lente. Là encore, nous assistons à une diminution importante du nombre des microorganismes. Tous ne sont cependant pas détruits et il arrive, qu'après un temps plus ou moins long de conservation, on observe une nouvelle prolifération microbienne.

Nous avons porté sur le graphique I, les variations en fonction du temps des logarithmes du nombre de germes d'un même lait additionné des antiseptiques étudiés.

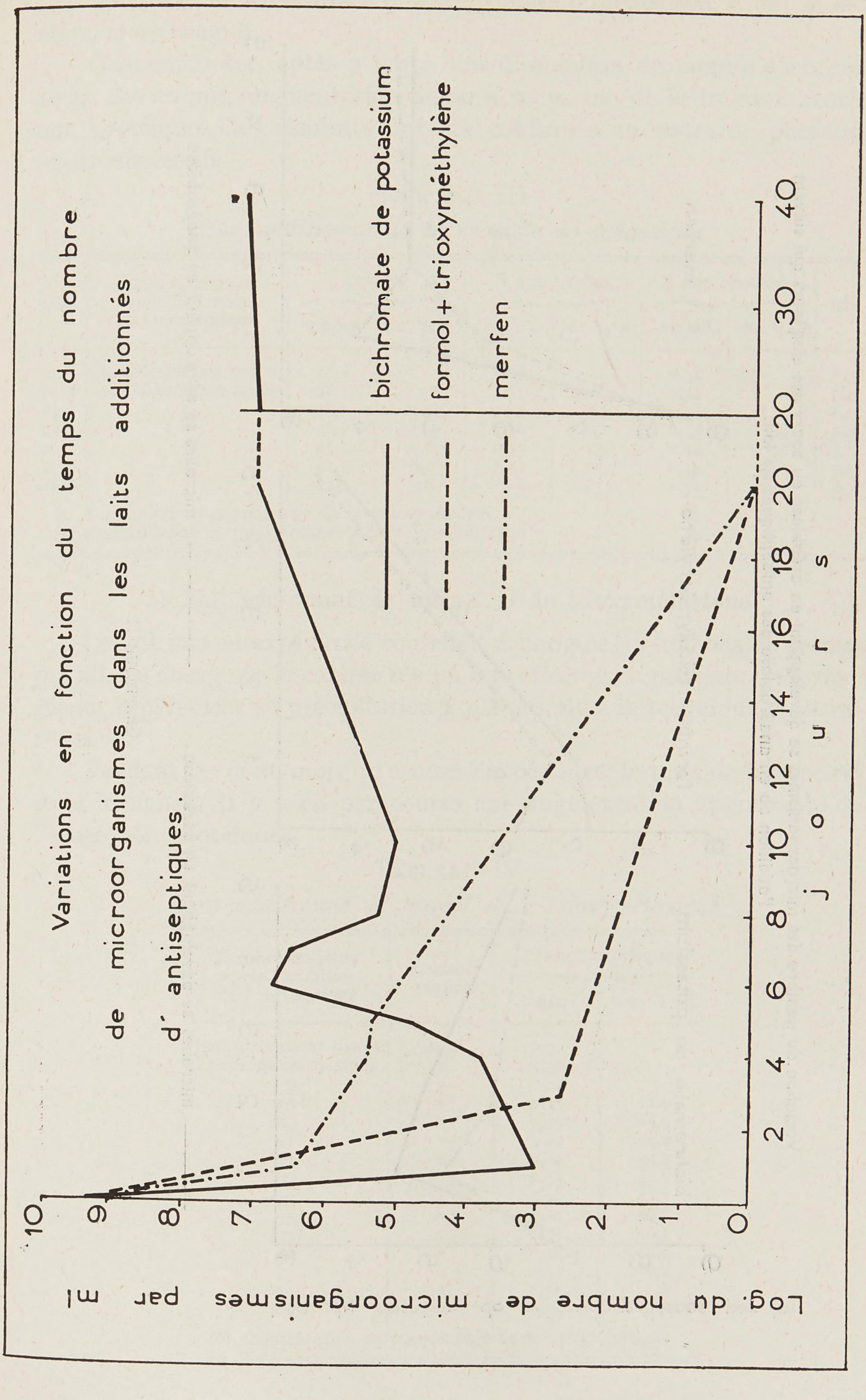
c) Microbes se développant en anaérobiose

Le nombre des microbes se développant en anaérobiose suit une évolution parallèle à celle des germes qui poussent sur la gélose en boites de Petri. Ce fait est mis en évidence par le graphique II, où sont portées les variations en fonction du temps des logarithmes du nombre de germes par ml de lait trouvés dans les deux cas.

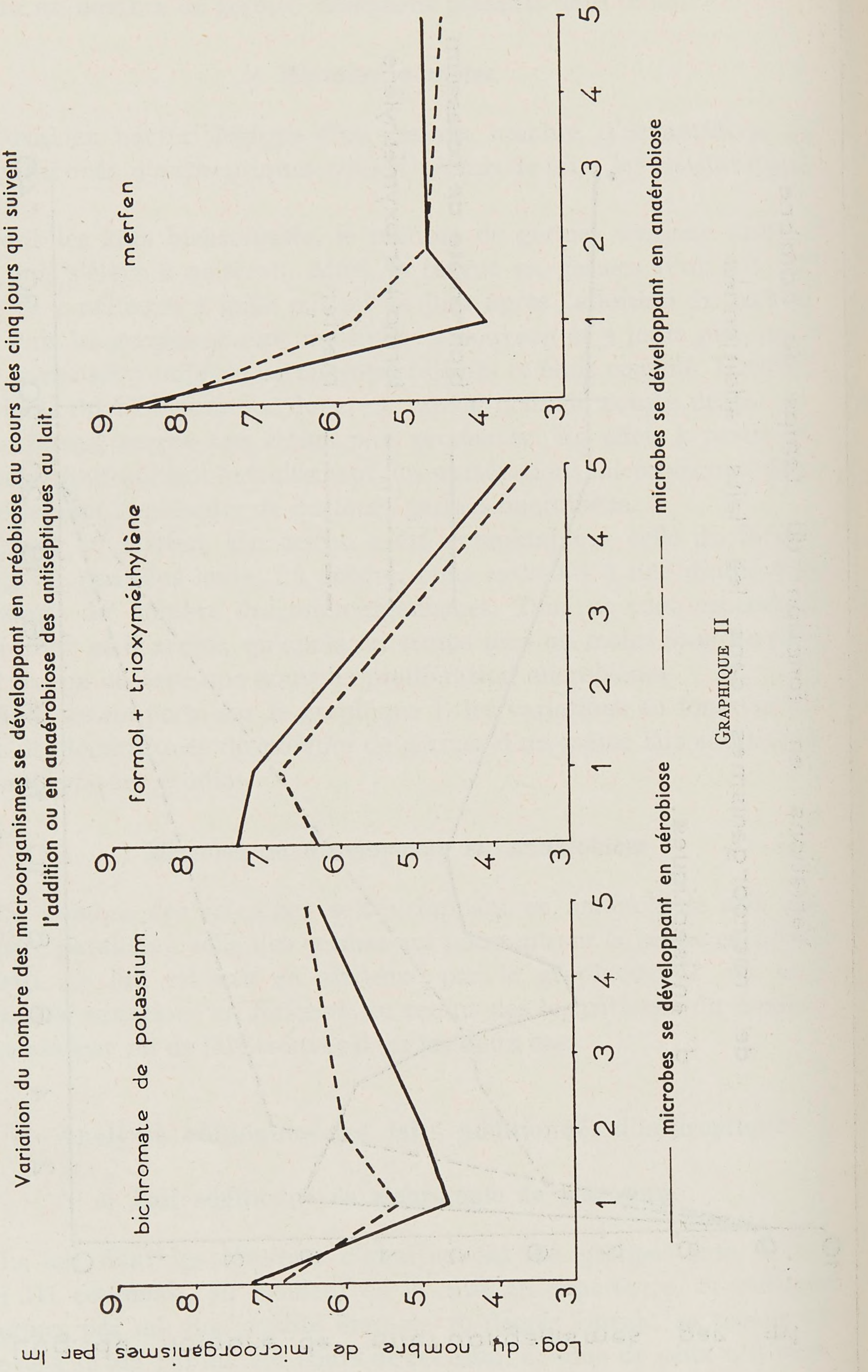
C. — Analyses chimiques des laits additionnés d'antiseptiques

a) Lait additionné de bichromate de potassium

Le lait dont les résultats d'analyse ont été groupés dans le tableau III contenait, au moment de la mise en expérience, 21 millions de germes par ml. Son acidité était de 19 degrés Dornic, sa teneur en azote de 5,58 mg par ml. Au cours de cet essai, comme de ceux qui vont suivre, la teneur en azote n'a pas varié sensiblement.


Variations en fonction du temps du nombre de microorganismes dans les laits additionnés d' antiseptiques.
bichromate de potassium
formol + trioxyméthylène
merfen
Log. du nombre de microorganismes par ml
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 20 30 40
j o u r s

GRAPHIQUE I



GRAPHIQUE II

L'expérience a été arrêtée après 7 jours d'incubation à 30°, le lait étant alors coagulé.

On peut noter, après 7 jours, une diminution du lactose d'environ 10 p. 100 et une augmentation de 60 à 70 p. 100 de la fraction azotée non protéique. Ces résultats ont été confirmés au cours de plusieurs essais successifs.

TABLEAU III

Lait additionné de bichromate de potassium

Date	Nombre de jours après l'addition de l'antiseptique	Lactose		N non caséine		N non protéique		pH
		mg/ml	var. % (*a*)	mg/ml	var. % (*b*)	mg/ml	var. % (*b*)	
21/7	immédiatement avant	48,4		1,28		0,31		6,3
21/7	immédiatement après	48,4		1,27		0,31		6,3
22/7	1	46,2	4,5	1,34	4,5	0,31		6,2
23/7	2	46,2	4,5	1,36	6,2	0,35	12,9	5,8
26/7	5	45,1	6,8	1,45	13,2	0,44	41,9	5,1
27/7	6	44,5	8,0	1,52	18,7	0,49	58,0	5,1
28/7	7	42,7	9,8	1,60	25,0	0,52	67,7	4,7

(*a* diminution en pourcentage de la valeur initiale.
(*b*) augmentation en pourcentage de la valeur initiale.

b) **Lait additionné de formol et de trioxyméthylène**

Le lait mis en expérience contenait à l'origine 35 millions de germes par ml. Le dosage de la caséine n'a pu être effectué, la présence du formol gênant rapidement sa précipitation à pH 4,6 selon la technique de ROWLAND.

Pendant les deux mois qu'a duré l'expérience, le taux de lactose est resté inchangé. Il y a eu par contre une augmentation appréciable de l'azote non protéique.

TABLEAU IV

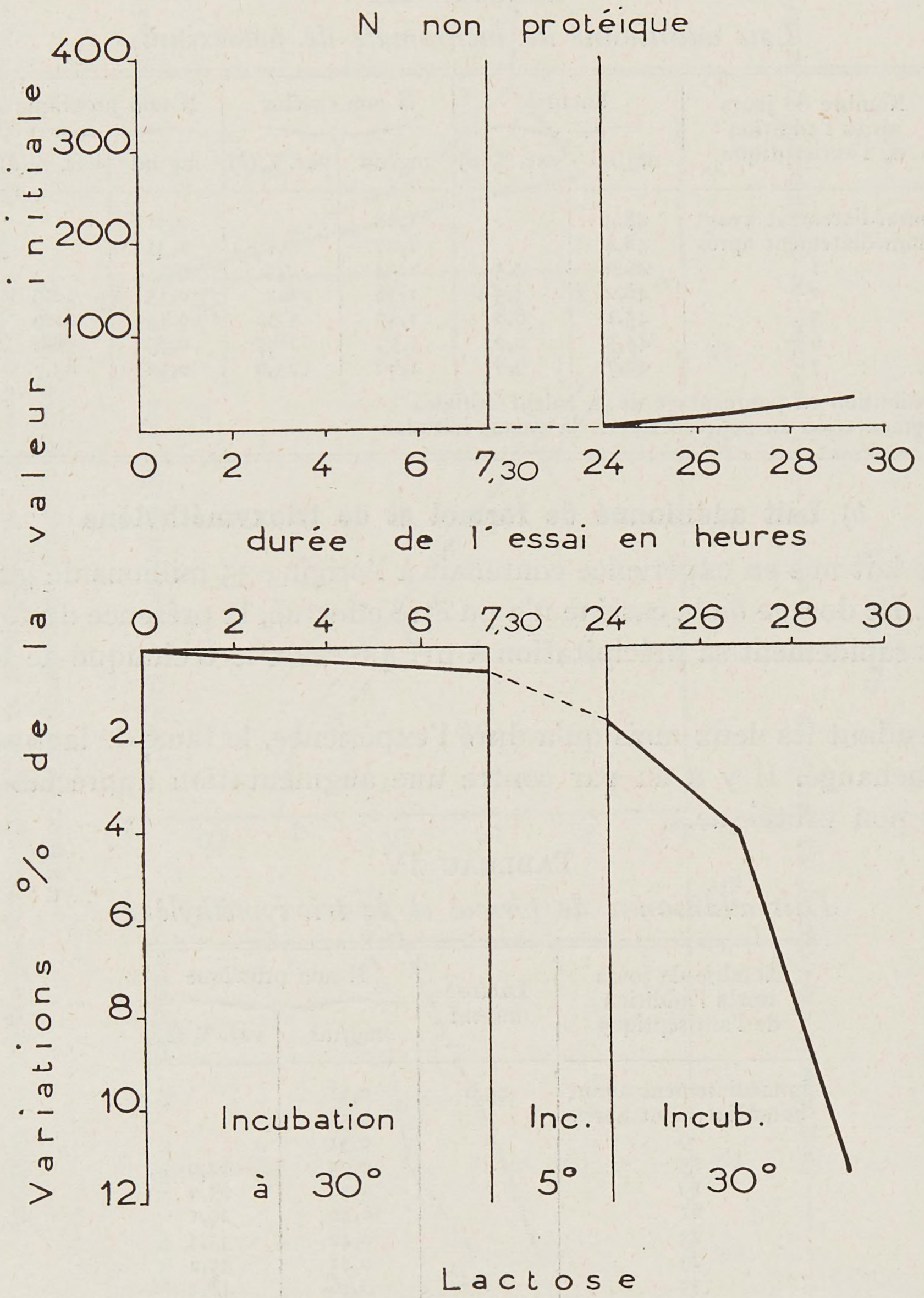
Lait additionné de formol et de trioxyméthylène

Nombre de jours après l'addition de l'antiseptique	Lactose mg/ml	N non protéique	
		mg/ml	var. % (*b*)
immédiatement avant	49,0	0,31	
immédiatement après	«	0,31	
9	«	0,31	
15	«	0,35	12,9
19	«	0,39	25,9
21	«	0,40	29,1
23	«	0,42	35,4
29	«	0,45	45,2
33	«	0,46	48,3
35	«	0,47	56,1
37	«	0,47	56,1
40	«	0,49	58,0
47	«	0,50	61,2
54	«	0,50	61,2
61	«	0,54	74,2

(*b*) augmentation en pourcentage de la valeur initiale.

Variations de l'azote non protéique

et du lactose d'un lait témoin.



GRAPHIQUE III

c) Lait additionné de merfen

Les résultats d'un essai portés sur le tableau V montrent, qu'après 15 jours environ à 30°, le lactose a faiblement diminué tandis que l'azote non protéique a considérablement augmenté.

TABLEAU V

Lait additionné de merfen

Nombre de jours après l'addition de l'antiseptique	Lactose		N non caséine		N non protéique	
	mg/ml	var. % (*a*)	mg/ml	var. % (*b*)	mg/ml	var. % (*b*)
immédiatement avant	45,1		1,02		0,30	
immédiatement après	45,1		1,01		0,30	
2	45,1		1,20	17,7	0,47	56,7
6	45,1		1,75	71,6	0,77	156,7
8	45,1		1,84	80,4	0,91	203,3
10	45,1		1,96	92,1	1,05	250,0
13	45,1		2,17	112,7	1,19	296,7
15	43,4	3,7	2,32	127,5	1,34	346,6
20	43,4	3,7	2,42	137,2	1,48	393,4
27			2,74	171,2	1,76	486,6
34	43,3	4,0	2,92	186,2	2,08	593,3

(*a*) diminution en pourcentage de la valeur initiale.
(*b*) augmentation en pourcentage de la valeur initiale.

A titre de comparaison, nous avons porté respectivement sur les graphiques III et IV les variations en fonction du temps de l'azote non protéique et du lactose d'un échantillon de lait sans antiseptique et de laits additionnés d'antiseptiques.

d) Évolution de l'acidité des laits additionnés d'antiseptiques

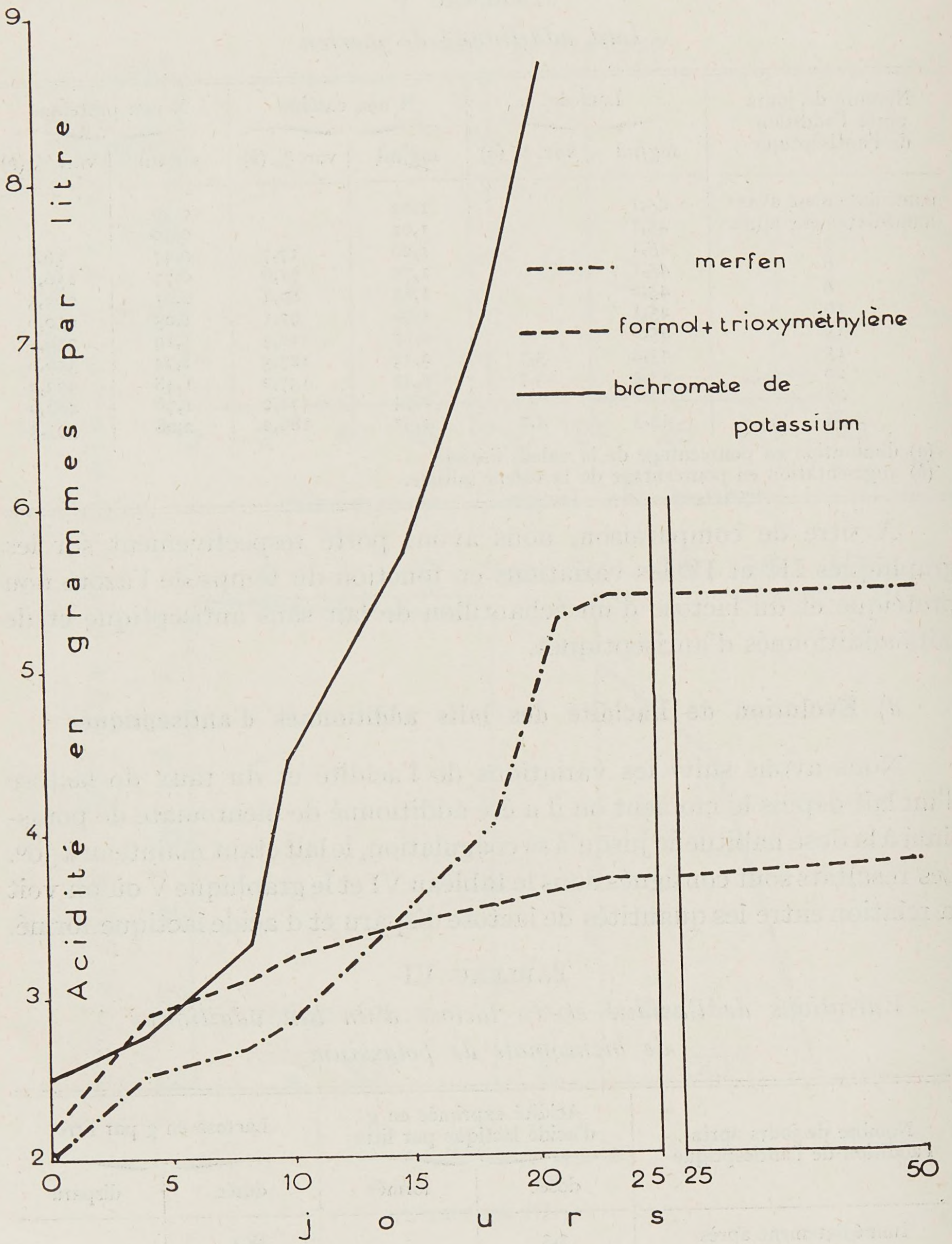
Nous avons suivi les variations de l'acidité et du taux de lactose d'un lait depuis le moment où il a été additionné de bichromate de potassium à la dose habituelle jusqu'à sa coagulation, le lait étant maintenu à 30°. Les résultats sont consignés dans le tableau VI et le graphique V où on voit la relation entre les quantités de lactose disparu et d'acide lactique formé.

TABLEAU VI

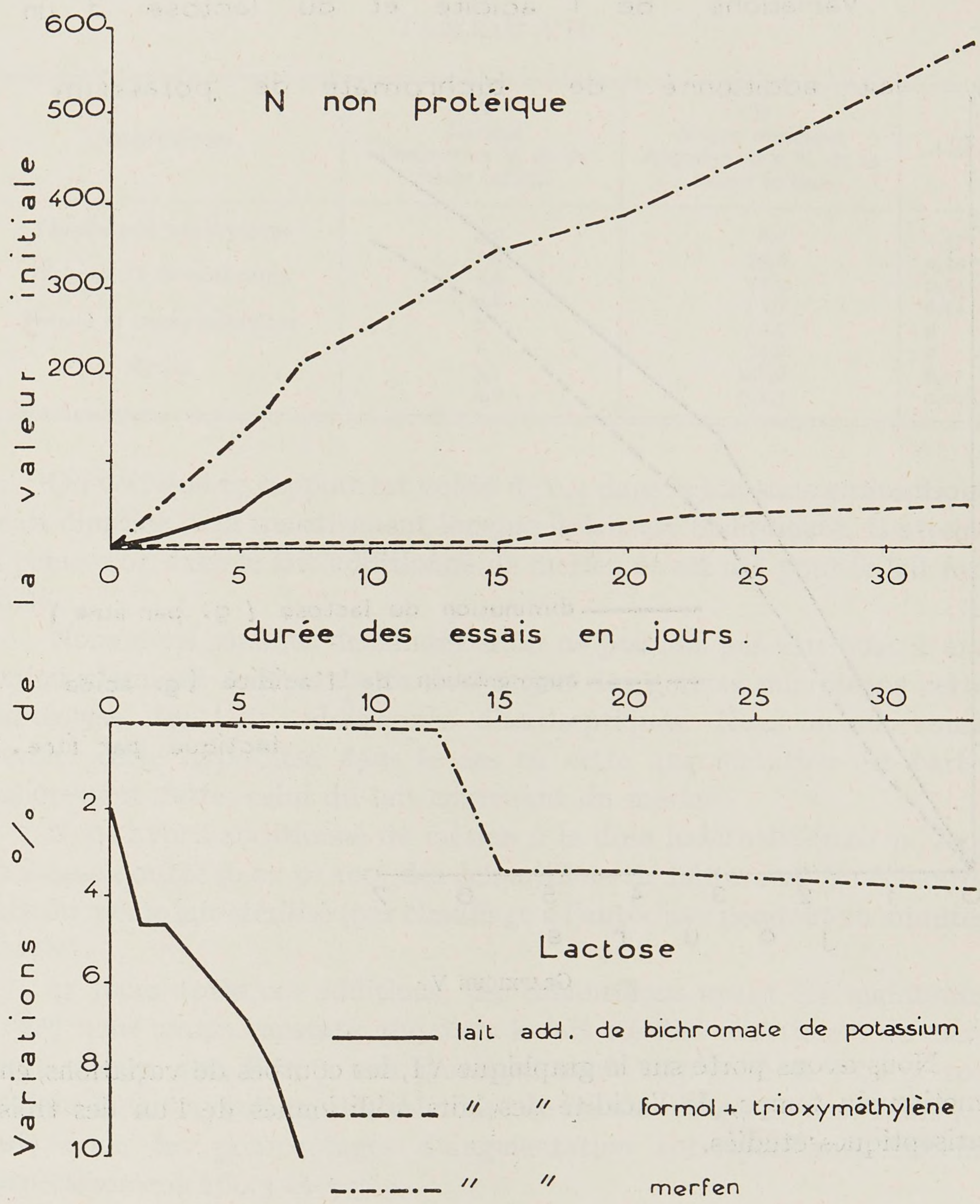
Variations de l'acidité et du lactose d'un lait additionné de bichromate de potassium

Nombre de jours après l'addition de l'antiseptique	Acidité exprimée en g d'acide lactique par litre		Lactose en g par litre	
	dosée	formée	dosée	disparu
Immédiatement après	3,3		48,1	
1	4,1	0,8	47,0	1,1
3	6,0	2,7	44,8	3,3
6	7,8	4,5	43,0	5,1
7	8,2	4,9	42,5	5,6

Variations de l'acidité d'un lait additionné de différents antiseptiques



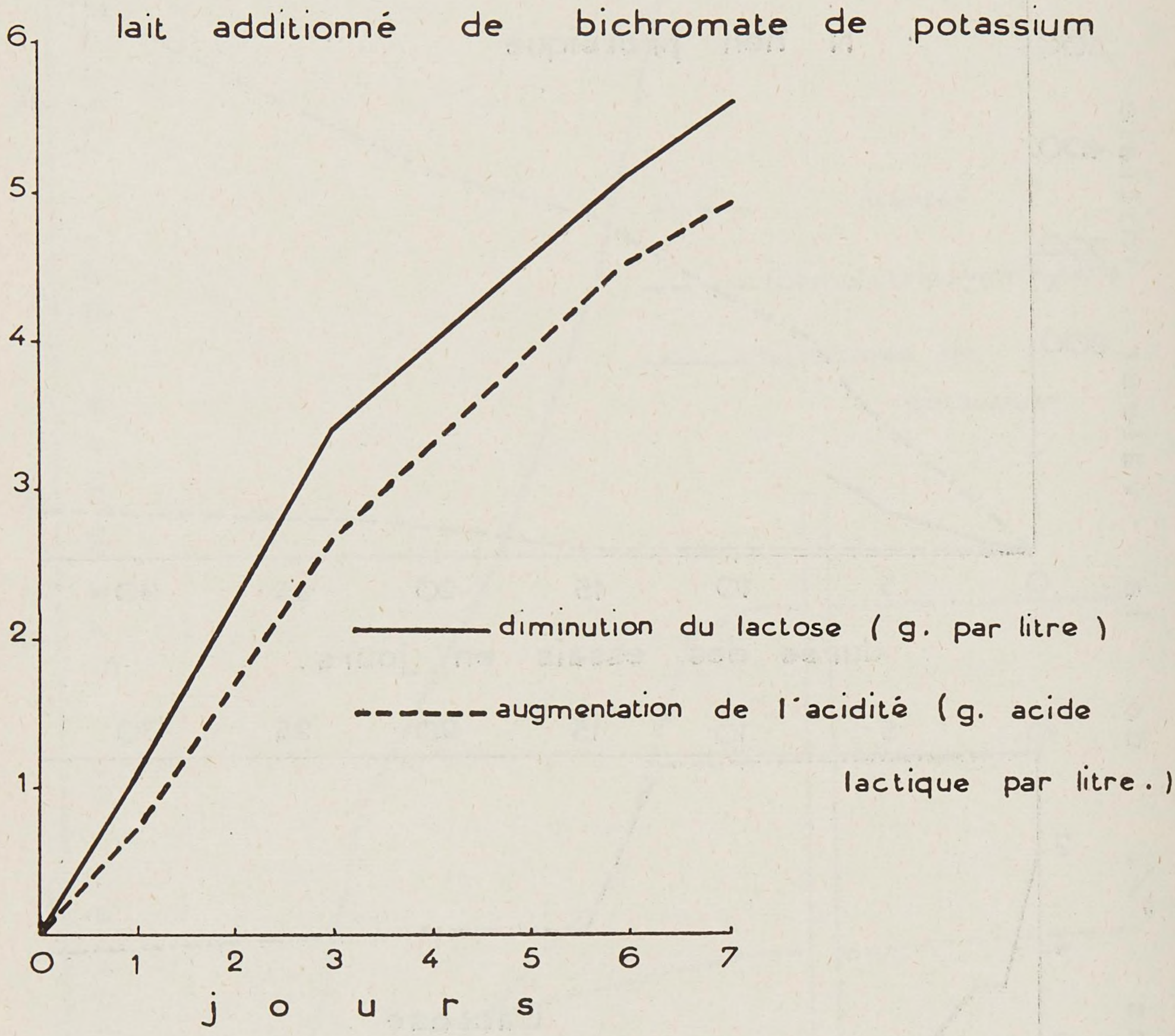
GRAPHIQUE VI



GRAPHIQUE IV

Dans le cas du formol, on observe au début une acidification dont on peut rendre responsable la réaction entre le formol et les groupes aminés de la caséine. Ensuite, l'acidité reste constante. Nous avons vu plus haut que le taux de lactose ne variait pas.

Pour le lait additionné de merfen, l'acidité s'élève pendant les 20 premiers jours, puis reste constante.



GRAPHIQUE V

Nous avons porté sur le graphique VI, les courbes de variations, en fonction du temps, de l'acidité des laits additionnés de l'un des trois antiseptiques étudiés.

e) Protéolyse des laits additionnés d'antiseptiques

Que le lait ait été ou non additionné d'antiseptique, nous avons toujours observé une protéolyse mesurable. Exception faite des laits auxquels on a ajouté formol et trioxyméthylène, nous avons constaté

également la disparition d'une partie du lactose. Mais l'intensité de ces deux phénomènes s'est révélée extrêmement différente suivant les cas.

Pour illustrer ce fait, nous avons porté sur un même tableau (tableau VII), pour le lait témoin et pour les laits additionnés d'antiseptiques, les pourcentages d'augmentation de l'azote non protéique, les pourcentages de lactose disparu et enfin le rapport entre ces deux valeurs.

TABLEAU VII

Antiseptiques	A Lactose Diminution % de sa valeur initiale	B N non protéique Augmentation % de sa valeur initiale	A/B
Témoin sans antiseptique	4,0	8,5	0,47
	11,2	25,0	0,44
Bichromate de potassium	4,5	12,9	0,34
	9,8	67,7	0,14
Formol et trioxyméthylène	0	12,9	0
	0	74,2	0
Merfen	3,7	346,6	0,01
	4,0	593,3	0,007

On voit que ce rapport est voisin de 0,4 dans le lait sans antiseptique mais diminue déjà sensiblement lorsque le lait est bichromaté. Il atteint à peine 0,01 dans le lait additionné de merfen et est nul pour le lait formolé.

Nous nous sommes demandés si on ne pouvait pas attribuer à une action chimique indépendante de l'action des germes microbiens cette protéolyse des laits additionnés d'antiseptiques. Nous avons voulu vérifier cette hypothèse dans le cas où cette augmentation est particulièrement nette, celui du lait contenant du merfen.

Nous avons additionné de merfen à la dose habituelle (0,01 p. 100) et à dose double (0,02 p. 100) des échantillons de lait cru et des échantillons du même lait stérilisé (par chauffage à l'autoclave pendant 20 minutes à 118°).

47 jours après ces additions, (les échantillons ayant été maintenus à 30°) nous avons constaté que dans le lait stérilisé additionné de merfen à 0,01 p. 100, l'azote non protéique avait augmenté de 10,1 p. 100 et dans le lait ayant reçu double dose de merfen de 4,4 p. 100. Dans les laits crus, les pourcentages d'augmentation correspondants étaient respectivement 166,3 et 978,4.

Nous sommes donc en droit de conclure que la protéolyse résultant de l'action propre de l'antiseptique ajouté au lait très est faible par rapport à celle que l'on observe avec du lait cru et que cette dernière résulte bien de la présence de microorganismes ou des enzymes qu'ils produisent.

Le fait que les microorganismes du lait cru additionné d'antiseptique ne

sont plus capables de se développer — ou seulement en petit nombre — sur les milieux de culture semble en faveur d'une action enzymatique provenant des corps microbiens.

On doit noter cependant que la présence d'un antiseptique ne permet pas de compter avec certitude les germes présents lorsque ceux-ci sont peu nombreux, en particulier dans le cas du merfen pour lequel la protéolyse est aussi la plus marquée. Il est donc possible que cette protéolyse soit due à un petit nombre de germes qui restent vivants et actifs mais qu'il n'est pas possible de déceler sur les milieux de culture avec la technique que nous avons suivie.

Nous avons vu d'autre part que la présence d'un antiseptique dans le lait inhibe moins la protéolyse que la dégradation du lactose. On peut penser que l'antiseptique agit soit en opérant une sélection des microorganismes soit en modifiant le système enzymatique des germes présents, chaque antiseptique possédant à cet égard une action qui lui est propre.

IV. — CONCLUSION

Aucun des antiseptiques essayés ne permet, à la dose où ils ont été utilisés, une stabilisation complète du lait.

Le bichromate n'évite ni la coagulation du lait ni sa protéolyse, ce qui complique le prélèvement d'un échantillon homogène. De plus le taux de lactose, dont la détermination est capitale dans la recherche des fraudes par mouillage, diminue rapidement. Le bichromate ne peut donc pas être considéré comme un bon agent de conservation des échantillons de lait.

Le merfen, s'il freine considérablement la destruction du lactose, favorise par contre la protéolyse. Après un temps assez long, l'altération devient souvent visible à l'œil nu, le lait prenant un aspect particulier : une fine floculation se produit au sein d'un liquide translucide.

Dans les laits additionnés de formol et de trioxyméthylène, cette altération visible ne se manifeste pas, bien qu'il y ait une certaine augmentation de l'azote non protéique. Par ailleurs, le taux de lactose reste pratiquement inchangé.

Pour ces raisons, la technique qui consiste à ajouter au lait destiné aux analyses, du formol et du trioxyméthylène nous paraît la plus recommandable. Ajoutons enfin qu'elle a l'avantage de ne pas mettre en œuvre un produit toxique.

Reçu pour publication le 5 *mai* 1956

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) ROCQUES (X.). — La conservation des échantillons de lait destinés à à l'analyse. *Ann. Fals. Fraudes*, 1912, 338.
(2) KLING (A.), GELIN et LASSIEUR. — Recherches sur l'altération des laits bichromatés. *Ann. Fals. Fraudes*, 1914, 244.
(3) MAGNIER de la SOURCE (L.). — Observations sur la valeur du procédé officiel de conservation des laits par le bichromate. *Ann. Fals. Fraudes*, 1920, 550.
(4) HINARD (M.). — L'altération des laits bichromatés. *Ann. Fals. Fraudes*, 1913, 233 et 1920, 463.
(5) FILAUDEAU. — La conservation des échantillons de lait. *Ann. Fals. Fraudes*, 1923, 515.
(6) LETOURNEUR, HUGON et VALIN. — Conservation des échantillons de lait par le formol et le trioxyméthylène. *Ann. Fals. Fraudes*, 1926, 544.
(7) DENIGES (G.). — La conservation des échantillons de lait destinés à l'analyse. *Ann. Fals. Fraudes*, 1912, 599.
(8) FONZES-DIACON et LAFORCE. — Le chromiforme : nouveau conservateur des laits d'expertise, *Ann. Fals. Fraudes*, 1928, 536.
(9) VOIRET (M.). — Conservation des échantillons de lait en vue de leur analyse. *Ann. Fals. Fraudes*, 1951, 284.
(10) GUITTONNEAU (G.) et CHEVALIER (R.). — Nouvelles techniques de préparation d'un milieu de culture à base de lait digéré. Le lait digéré par la papaïne. *Le lait*, **21**, 1941, 1.
(11) HIRSCH (A.) et GRINSTED (E.). — Methods for the growth and enumeration of anaerobic spore formers from cheese, with observations on the effect of nisin. *J. Dairy Res.*, **21**, 1954, 101.
(12) DORNER (W.), DEMONT (P.) et CHAVANNES (D.). — Microbiologie laitière, 1945, 193.
(13) SAENZ LASCANO RUIZ (I.). — Le dosage du lactose dans les laits altérés par fermentation lactique. Les conditions d'hydrolyse quantitative du lactose dans un lactoserum. *Ann. Fals. Fraudes*, 1954, 167 et 285.
(14). ROWLAND (S. J.). — The determination of the nitrogen distribution in milk. *J. Dairy Res.*, **9**, 1938, 42.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES SUBSTANCES INSAPONIFIABLES DES HUILES DE GRAINES DE CRUCIFÈRES

PAR

M. Émile ANDRÉ et Mlle Monique MAILLE

Laboratoire des Oléagineux Métropolitains,
Bellevue.

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Méthodes officielles de dosage de l'insaponifiable.

II. — Étude de l'insaponifiable.

III. — Nouvelle technique de dosage.

IV. — Recherches sur l'insaponifiable.
Dosage des stérols.
Dosage des carotènes.

V. — Conclusions.

Découvertes dès 1819 par CHEVREUL, les substances insaponifiables ont été étudiées depuis par de nombreux auteurs. Plusieurs méthodes pour doser ces substances ont été mises au point. Deux d'entre elles sont considérées comme officielles parce qu'elles figurent dans les « Méthodes unifiées pour l'analyse des matières grasses » publiées par les soins de « L'Union internationale de chimie pure et appliquée ». Nous avons tenu cependant à en vérifier la précision avant d'aborder l'étude des substances insaponifiables elles-mêmes.

Pour diverses raisons que nous ne voulons pas développer en détail, nous avons estimé utile de placer sous les yeux du lecteur le texte intégral des deux méthodes proposées par l'Union internationale de chimie pure et appliquée.

I. — APPLICATION DES MÉTHODES OFFICIELLES DE DOSAGE DE L'INSAPONIFIABLE

Les huiles étudiées ont été préparées par nous au Laboratoire, à partir de graines de Crucifères provenant de diverses régions de France et même de plusieurs pays étrangers (Suède, Hollande, Italie).

Nos essais ont porté sur des graines de Colza, des graines de Navette

et des graines de moutarde noire, dont les récoltes s'échelonnent sur les années 1949 à 1954. Les huiles de pression ont été obtenues à froid à l'aide d'une petite presse hydraulique de Laboratoire ; les huiles d'extraction ont été obtenues par épuisement du tourteau de pression dans l'allonge de Soxhlet au moyen d'essence de pétrole (Eb. 55-70°C).

Nous étudierons d'abord les résultats des essais effectués en vue de déterminer la valeur exacte des « méthodes officielles », auxquelles nous avons du apporter par la suite diverses modifications.

***

Nous avons déjà dit plus haut que les procédés utilisés ont au nombre de deux. Ils sont basés l'un et l'autre sur le même principe, savoir : saponification d'une huile ou d'une graisse par une solution alcoolique (alcool à 95°) de potasse caustique, et épuisement de la solution savonneuse diluée, par agitation avec un solvant volatil, non miscible capable de dissoudre les substances qui n'ont pas été transformées en savon.

Par évaporation du solvant on obtient les Substances Insaponifiables.

Dans la première méthode on utilise l'éther de pétrole léger comme solvant (Eb. 35-55°) ; dans la deuxième méthode, on utilise l'éther sulfurique ou éther ordinaire.

Méthodes

A) *A l'éther de pétrole*

Dans un ballon muni d'un réfrigérant ascendant on pèse avec précision 5 g de corps gras, on y ajoute 50 ml d'une solution environ 2 × N d'hydroxyde de potassium dans l'éthanol à 95 p. 100 (en volume), on porte à légère ébullition que l'on maintient pendant une heure. On ajoute alors par le haut du réfrigérant 50 ml d'eau distillée. On agite, on laisse refroidir, et l'on transvase le contenu du ballon dans une ampoule à décantation. On rince le ballon, en opérant en plusieurs fois, avec 50 ml au total d'éther de pétrole (éb. 40-60°C. ind. de Br $<$ 1) redistillé, exempt de résidu, qui est ensuite transvasé dans l'ampoule à décantation. On agite énergiquement et pendant une minute pour assurer un contact intime entre l'éther de pétrole et la solution savonneuse. On abandonne au repos et, quand les deux phases sont complètement séparées, on soutire dans une deuxième ampoule à décantation, la solution savonneuse qu'on épuise de nouveau avec 50 ml d'éther de pétrole neuf, on décante et l'on fait un troisième épuisement de la solution savonneuse par 50 ml d'éther de pétrole neuf. Des émulsions, se présentant par exception, sont détruites par l'addition de petites quantités d'éthanol ou de lessive de potasse concentrée.

Les trois portions d'éther de pétrole sont alors réunies dans une même ampoule ; on les lave trois fois de suite avec, chaque fois, 50 ml d'éthanol à

50 p. 100 (en volume). On transvase la solution d'éther de pétrole dans un petit ballon, chasse le solvant par distillation et sèche à 100°.

Dans ce but, on porte dans une étuve réglée à 100° le ballon maintenu dans une position horizontale. Après un quart d'heure de séjour à l'étuve, on laisse refroidir et on pèse. On fait des pesées de quart d'heure en quart d'heure jusqu'à ce que la perte de poids entre deux pesées consécutives soit inférieure à 0,10 p. 100. Si ce résultat n'est pas obtenu après trois périodes de séchage, il y a lieu de supposer la présence de matières insaponifiables étrangères à l'insaponifiable naturel.

En suivant rigoureusement cette technique, l'insaponifiable est exempt de savon. Néanmoins pour éviter les causes d'erreur, qui résulteraient d'un entraînement accidentel, on incinérera l'insaponifiable obtenu et, s'il laisse des cendres, on en dosera l'alcalinité en présence d'hélianthine avec une liqueur acide décinormale : un centimètre cube de cette liqueur représente 0,032 g de savon de potasse à déduire.

B) *A l'oxyde d'éthyle*

Peser exactement cinq grammes de matière grasse dans un ballon de 250 ml et ajouter approximativement 50 ml de potasse alcoolique N. La couleur de la solution alcoolique de potasse ne devra pas être plus foncée que la couleur jaune paille. Adapter le flacon à un réfrigérant à reflux, et chauffer au bain-marie bouillant pendant une heure en agitant de temps en temps.

Retirer le ballon du bain. Enlever le réfrigérant et transvaser le contenu du ballon dans une ampoule à décantation de 500 ml. Laver avec 500 ml d'eau en tout.

Rincer le ballon avec 100 ml d'oxyde d'éthyle (D-0,720-0,724) et verser dans l'ampoule. Boucher l'ampoule et agiter vigoureusement pendant que le contenu est encore légèrement chaud, et tenir l'ampoule verticale jusqu'à ce que les deux phases liquides se séparent limpides (1).

Extraire la couche hydroalcoolique et la verser dans le ballon employé pour la saponification. Extraire la couche éthérée par le haut de l'ampoule et verser dans une seconde ampoule à décantation de 500 ml contenant 40 ml d'eau. Épuiser la solution hydroalcoolique de savon, deux fois encore, et chaque fois avec 100 ml d'oxyde d'éthyle de la même manière. Réunir les trois fractions dans la deuxième ampoule à décantation. Si les fractions d'oxyde d'éthyle contenaient des matières solides en suspension, on aurait soin de les filtrer, en lavant le filtre avec un peu d'oxyde d'éthyle. Faire tourner l'ampoule contenant l'oxyde et les 40 ml d'eau, sur elle-même sans secousses violentes, puis, après séparation soutirer l'eau de lavage.

Laver la solution d'oxyde d'éthyle deux fois avec 40 ml d'eau en agitant vigoureusement chaque fois. Puis laver successivement avec 40 ml de potasse aqueuse 0,5 N, 40 ml d'eau, et de nouveau avec 40 ml de potasse aqueuse 0,5 N, et encore au moins deux fois, avec 40 ml d'eau. Continuer les lavages à l'eau jusqu'à ce que les eaux de lavage ne donnent plus de réaction rose par addition d'une solution de phénolphtaléine.

Transvaser la solution d'oxyde d'éthyle dans un ballon taré, puis évaporer à petit volume. Ajouter 6 ml d'acétone et enlever complètement le dissolvant volatil du ballon en s'aidant d'un léger courant d'air, le ballon se trouvant

(1) Au cas où une émulsion persisterait, causée par une alcalinité trop forte du milieu on ajouterait quelques gouttes d'une liqueur chlorhydrique N.

presque entièrement immergé, le tenir obliquement et le faire tourner dans un bain d'eau bouillante.

Terminer alors le séchage à l'étuve à 100°C dans les conditions indiquées dans la méthode à l'éther de pétrole.

Dissoudre le contenu dans 20 ml d'éthanol à 95 p. 100 (en volume) fraîchement bouilli et neutralisé, et titrer avec une solution de potasse alcoolique 0,1 N en présence de phénolphtaléine.

Si le titrage ainsi obtenu n'excède pas 0,1 ml, calculer la proportion de matière insaponifiable dans la matière grasse en divisant le poids du résidu obtenu par le poids de la prise d'essai et en multipliant par 100. Mais si le titrage excède 0,1 ml le dosage doit être recommencé entièrement.

II. — ÉTUDE DE L'INSAPONIFIABLE

Après avoir rigoureusement suivi les modes opératoires prescrits nous avons obtenu des résultats dont la concordance est satisfaisante si l'on emploie la méthode à l'éther ordinaire. Avec la méthode à l'éther de pétrole nous avons eu la surprise d'obtenir des résultats assez inconstants et toujours nettement inférieurs à ceux que l'on obtient par la méthode à l'éther sulfurique. La différence des résultats fournis par les deux procédés peut atteindre jusqu'à 50 p. 100 du poids de l'insaponifiable. C'est ainsi que, pour une huile de pression obtenue à partir des graines de « Colza Lembke Alsace » nous avons obtenu :

Matières insaponifiables : 1,1 p. 100 par la méthode à l'éther ordinaire, résultat enregistré 5 fois, les plus grands écarts allant de 1,0 à 1,2 p. 100 ; par la méthode à l'éther de pétrole nos résultats oscillent autour de 0,50 p. 100 seulement.

L'huile de pression extraite des graines d'un Colza nain de Hambourg d'origine hollandaise, nous a donné :

Matières insaponifiables : 1,17 et 1,10 p. 100 par la méthode à l'éther ordinaire ; 0,51 et 0,55 p. 100 par la méthode à l'éther de pétrole.

Par ailleurs l'aspect des substances extraites par les 2 procédés est nettement différent ; l'éther de pétrole a fourni un produit cristallisé en longues aiguilles blanches ou à peine colorées, tandis que l'éther sulfurique donne un produit jaune orangé foncé, d'aspect cristallin beaucoup moins net.

Nous avons alors pensé que les substances insaponifiables retenues par la solution savonneuse traitée à l'éther de pétrole, seraient sans doute extraites par un traitement subséquent de cette solution avec l'éther ordinaire. Ce traitement supplémentaire nous a effectivement donné une nouvelle quantité d'insaponifiable ; la somme des deux extraits obtenus est sensiblement la même que celle que l'on obtient d'emblée dar la méthode à l'éther ordinaire.

Dans le cas des huiles de Colza de pression citées plus haut nous avons obtenu les résultats suivants :

TABLEAU I

Huiles	Méthode à l'éther de pétrole %	Traitement supplémentaire à l'éther ordinaire %	Total %	Méthode à l'éther ordinaire %
Colza Lembke–Alsace	0,57 0,63	0,43 0,40	1,0 1,03	1,1 (5 fois) 1,2
Colza nain de Hambourg..	0,51 0,55	0,49 0,53	1,0 1,08	1,17 1,10

Il nous a paru utile de vérifier si le dosage double était rigoureux et dans quelle mesure la solution savonneuse ne retenait plus de substances insaponifiables.

A cet effet la solution savonneuse épuisée par les traitements successifs à l'éther de pétrole et à l'éther, a été traitée à l'ébullition par un excès d'acétate de baryum en solution aqueuse à 20 p. 100.

Les savons de baryum précipités ont été ensuite lavés et séchés ; on les a lixiviés avec de l'acétone dans une allonge de Soxhlet. L'extrait obtenu après distillation de l'acétone contient une petite quantité de savons de baryum et les matières insaponifiables qui avaient échappé aux traitements antérieurs.

On élimine les savons de baryum par un traitement à l'acide chlorhydrique dilué à chaud ; le mélange d'acides gras et d'insaponifiable surnage ; il est séparé, lavé à l'eau, puis saponifié par de la potasse caustique en solution alcoolique ; enfin cette nouvelle solution savonneuse (qui contient fort peu de savon) a été épuisée par l'éther ordinaire. Par ce procédé nous avons encore pu récupérer une nouvelle quantité d'insaponifiable, qui s'ajoute à celles qui ont été obtenues par les traitements antérieurs. Nous appelons ce nouveau produit « Insaponifiable résistant ».

Son aspect est très différent de celui des autres substances insaponifiables obtenues auparavant. C'est une huile semi-fluide, de couleur brun foncé, et son pourcentage est très variable suivant les cas.

En résumant les résultats obtenus dans le tableau suivant, nous désignerons par A les substances extraites à l'éther de pétrole, par B, celles qui sont extraites par le traitement supplémentaire à l'éther ordinaire, et par C l'insaponifiable résistant.

TABLEAU II

Huiles	Substances extraites à l'éther de pétrole	Substances extraites par traitement supplémentaire à l'éther ordinaire	Insaponifiable résistant	Total
	A	B	C	A + B + C
Colza : Lembke-Alsace				
Huile de pression	0,57	0,43	0,37	1,37 %
	0,63	0,40	0,40	1,43
Colza: Nain de Hambourg				
Huile de pression	0,51	0,49	0,55	1,55 %
	0,55	0,53	0,51	1,59
Huile extraite du résidu de pression	0,94	0,64	0,54	2,12 %
	0,98	0,64	0,46	2,08
Autres huiles de pression, de graines de Crucifères :				
Navette d'hiver	0,55	0,52	0,57	1,65 %
Moutarde blanche	0,76	0,50	0,76	2,0 %
Moutarde noire (Alsace)	1,2	0,15	0,55	1,9 %
Chou Cavalier	0,77	0,47	0,60	1,84 %
Sanve	1,06	0,26	0,56	1,88 %

L'examen du tableau II montre que l'insaponifiable résistant représente 25 à 35 p. 100 de l'insaponifiable total, tant pour l'huile de colza que pour les autres huiles de graines de Crucifères étudiées ; mais nous pouvons compléter ce tableau de chiffres par un autre tableau III où sont consignés les résultats d'essais semblables faits : 1° sur des graines de Colza d'origine suédoise, et 2° sur des graines de Navette, dite Lanskrona, en provenance du département d'Eure-et-Loir.

TABLEAU III

Huiles	Substances insaponifiables extraites directement à l'éther	Insaponifiable résistant	Total %
Colza de Suède			
H. de pression.....	0,84	0,24	1,08 %
	0,80	0,24	1,04
H. d'extraction.....	1,30	0,24	1,54
	1,33	0,20	1,53
Navette Lanskrona			
H. de pression.....	1,01	0,26	1,27
	1,04	0,24	1,28
H. d'extraction.....	1,90	0,17	2,07
	1,86	0,17	2,03

Nous avons constaté que l'insaponifiable résistant ne représente plus guère ici que 15 à 22 p. 100 des substances insaponifiables totales.

En ce qui concerne les essais qui ont été pratiqués sur les huiles extraites de ces graines, nous nous sommes contentés de déterminer la quantité d'insaponifiable résistant à partir de la solution savonneuse

épuisée directement par l'éther ordinaire. Cette simplification est justifiée par le fait que la somme insaponifiable extrait d'abord par l'éther de pétrole + insaponifiable extrait ensuite par l'éther (insaponifiable A + insaponifiable B) est toujours sensiblement égale à la valeur que l'on obtient en procédant à l'extraction directe par l'éther ordinaire.

A titre de comparaison nous avons examiné des huiles, autres que celles de Crucifères ; elles contiennent aussi un insaponifiable résistant, mais la quantité en est parfois très faible ; les résultats obtenus figurent dans le tableau suivant :

TABLEAU IV (1)

Huiles	Substances extraites à l'éther de Pétrole	Substances extraites par traitement supplémentaire à l'éther ordinaire	Insaponifiable résistant	Total %
	A	B	C	A+B+C
Maïs (grains entiers)	2,5	0,9	0,27	3,7
Lin	1,0	0,55	0,36	1,9
Olive	0,62	0,28	0,33	1,2
Soja	0,51	0,30	0,28	1,1
Palme	0,65	0,26	0,10	1,0

La lecture des données numériques ci-dessus montre que l'insaponifiable résistant représente seulement 7,3 p. 100 et 10 p. 100 de l'insaponifiable total, dans le cas de l'huile de maïs et de l'huile de palme.

Dans le cas des trois autres huiles, le pourcentage de l'insaponifiable résistant atteint de 18 à 27 p. 100 de l'insaponifiable total.

III. — NOUVELLE TECHNIQUE DE DOSAGE

Revenant aux huiles de Crucifères, l'examen des résultats précédents permet d'observer une certaine constance dans le pourcentage d'insaponifiable résistant de chacune des huiles analysées. Nous avions déjà observé ce fait pour l'huile de Colza nain de Hambourg et pour celle d'un Colza Matador d'origine suédoise.

Nous avons pensé que nous pourrions obtenir cet insaponifiable en même temps que celui qui est extrait à l'éther, si nous augmentions le nombre des traitements.

Dans ce but, des essais furent entrepris sur de l'huile d'extraction, obtenue à partir de ces deux sortes de graines de colza, et à partir d'une variété de graines de moutarde noire d'Alsace, dite « Wintz ».

Voici le mode opératoire que nous avons suivi :

Vingt-cinq g d'huile ont été saponifiés par 200 cc de potasse caus-

(1) Ces déterminations ont été faites avec la collaboration de Mlle Marie CARBOUÈRES.

tique (solution alcoolique N) pendant 1 h à l'ébullition. Le ballon, adapté à un réfrigérant à reflux, est agité de temps en temps. On transvase ensuite le contenu du ballon dans une ampoule à décanter de 2l. On ajoute 500 cc d'eau distillée et rince le ballon avec 300 cc d'éther ordinaire que l'on verse dans l'ampoule. On bouche et agite vigoureusement l'ampoule pendant que le contenu est encore légèrement chaud. Laisser décanter, puis séparer la couche éthérée que l'on verse dans une autre ampoule à décanter de 2l contenant 150 cc d'eau. Traiter à nouveau de la même manière la solution savonneuse, 2 fois avec 200 cc d'éther et 5 fois avec 100 cc. On a pratiqué en tout 8 traitements à l'éther. On réunit toutes les solutions éthérées dans la même ampoule. On lave la solution éthérée avec de l'eau et de la potasse aqueuse $\frac{N}{2}$, comme il est indiqué dans la méthode de la Commission Internationale, en utilisant 150 cc de liquides de lavage au lieu de 40 cc.

Après évaporation de l'éther on obtient les matières insaponifiables.

La solution savonneuse est ensuite tiédie doucement au bain-marie (loin de toute flamme) pour chasser la majeure partie de l'éther qu'elle retient. On la porte ensuite à l'ébullition et ajoute 100 cc de solution aqueuse d'acétate de baryum à 20 p. 100 bouillante.

Après refroidissement le précipité de savons de baryum recueilli et lavé, est séché à l'étuve à 50°. On l'épuise ensuite dans une allonge de Soxhlet avec de l'acétone pendant 10 à 12 h. Le résidu obtenu après évaporation du solvant contient un peu de savons de baryum passés en solution et l'insaponifiable résistant.

Ce résidu est dissous dans 30 cc d'alcool à 95° et 30 cc d'acide chlorhydrique au 1/4 pour déplacer les acides des savons de baryum.

On chauffe légèrement au bain-marie ; les acides gras surnagent. On agite le tout avec 100 cc d'éther ; on laisse décanter et sépare la couche éthérée. On traite encore deux fois la liqueur sous-jacente avec 100 cc d'éther chaque fois et on réunit les liqueurs éthérées. Le mélange d'acides gras et d'insaponifiable dissous dans l'éther est lavé à l'eau distillée. Après distillation de l'éther les acides gras sont saponifiés par 40 cc de potasse alcoolique N pendant 1 h à l'ébullition. On épuise enfin la solution savonneuse (contenant d'ailleurs très peu de savon) par 3 fois 100 cc d'éther ; les 3 fractions réunies sont lavées à l'eau et à la potasse aqueuse comme dans la méthode de la Commission Internationale. Après évaporation de l'éther, on obtient l'insaponifiable résistant.

Les résultats obtenus par ce long mode opératoire sont réunis dans le tableau suivant. Comme il est dit plus haut, nous avons opéré sur des huiles d'extraction. A titre de comparaison nous donnons en même temps les chiffres obtenus pour le dosage sur 5 g d'huile.

TABLEAU V

Huiles d'extraction	Substances extraites à l'éther %	Insaponifiable résistant %	Total %
Colza nain de Hambourg			
Dosage sur 5 g huile, 4 traitements à l'éther	1,91	0,73	2,64
	1,93	0,76	2,69
Dosage sur 25 g huile, 8 traitements à l'éther	2,7	0,07	2,77
	2,7	0,14	2,84
Colza Matador			
Dosage sur 5 g huile 4 traitements à l'éther	1,60	0,66	2,26
	1,55	0,72	2,27
Dosage sur 25 g huile, 8 traitements à l'éther	2,0	0,20	2,20
Moutarde noire d'Alsace (Wintz)			
Dosage sur 5 g huile, 4 traitements à l'éther	3,38	0,39	3,77
	3,39	0,34	3,73
	3,40	0,34	3,74
Dosage sur 25 g huile, 8 traitements à l'éther	3,60	0,16	3,76
	3,60	0,15	3,75
	3,60	0,14	3,74

Comme on peut en juger on diminue beaucoup l'importance de l'insaponifiable résistant en modifiant comme nous l'avons fait le mode opératoire. De plus, la pesée d'huile étant 5 fois plus grande, l'erreur relative est moindre.

Il y aurait donc intérêt à opérer le dosage d'insaponifiable sur une prise d'essai supérieure à 5 g et à faire de plus nombreux traitements à l'éther, ce qui pourrait peut-être, dans les cas courants, donner une approximation suffisante de la teneur en substances insaponifiables d'une huile commerciale, en évitant le long dosage de l'insaponifiable résistant.

IV. — RECHERCHES SUR L'INSAPONIFIABLE

Au cours de nos recherches, notre attention a été attirée par les nombreuses différences constatées entre les huiles de pression et les huiles d'extraction.

Les huiles de pression sont d'une belle couleur jaune d'or et sans mauvais goût. Au contraire les huiles d'extraction sont fortement colorées en jaune brun, légèrement amères et d'odeur assez forte. Elles ont en outre une densité supérieure aux huiles de pression et sont beaucoup plus acides.

Sans nous étendre sur ces particularités nous tenons cependant à signaler que les huiles d'extraction sont toujours plus riches en sub-

stances insaponifiables que les huiles de pression (1) ; cette constatation faite sur les huiles citées plus haut a été vérifiée sur d'autres échantillons d'huiles, en particulier sur de l'huile de Moutarde noire d'Alsace (Brassica nigra, Koch) dont nous avons trois variétés différentes de graines, et sur une huile de Navette de printemps.

TABLEAU VI

Substances insaponifiables des huiles de graines de navette de printemps et de graines de moutarde noire

	Huiles de pression substances insaponifiables %			Huiles d'extraction substances insaponifiables %		
	Extraites à l'éther	Résistantes	Totales	Extraites à l'éther	Résistantes	Totales
Navette de printemps	0,90	0,32	1,22	1,95	0,12	2,07
(Bréhéville)	0,95	0,30	1,25	2,0	0,06	2,06
Moutarde noire d'Alsace ..	1,29	0,22	1,51	3,38	0,39	3,77
(Wintz)	1,28	0,22	1,50	3,39	0,34	3,73
	1,22	0,30	1,52	3,40	0,34	3,74
Moutarde noire d'Alsace ..	1,16	0,10	1,26	2,38	0,22	2,60
(Boquet)	1,20	0,12	1,32	2,46	0,18	2,64
Moutarde noire d'Italie ...	1,24	0,16	1,40	2,28	0,33	2,61
(Dagousset)	1,14	0,24	1,38	2,23	0,37	2,60

L'examen de ce tableau met en évidence la teneur beaucoup plus élevée des huiles d'extraction en substances insaponifiables ; elle est environ deux fois plus grande et même 2,5 fois plus grande (dans le cas de l'huile de Moutarde noire Wintz) que celle des huiles obtenues par simple pression.

Si l'on ajoute que la couleur, l'odeur et l'acidité des huiles d'extraction sont nettement plus accusées, on arrive à cette conclusion qu'il serait préférable, au cours de la fabrication industrielle des huiles de graines de Crucifères, de ne pas mélanger les huiles de pression et les huiles d'extraction, les premières ne nécessitant qu'un léger raffinage pour devenir des huiles comestibles, tandis qu'il n'en va pas de même pour les secondes qui doivent être soumises à une épuration poussée.

Outre la plus forte teneur des huiles d'extraction en matières insaponifiables, l'étude de ces substances nous a révélé qu'elles possèdent une teneur plus élevée en stérols et en pigments caroténoïdes.

DOSAGE DES STÉROLS

Le dosage des stérols est basé sur la formation d'un complexe d'addition avec la digitonine ; le complexe est ensuite lavé, séché et pesé.

(1) Cette remarque a été faite depuis longtemps et dans de nombreux cas.

La digitonine est un hétéroside extrait des semences de « Digitalis purpurea » ; elle cristallise en aiguilles incolores ; sa formule brute est $C_{55}H_{94}O_{28}$. Mais son prix élevé lui fait préférer la natigine, glucoside qui paraît être de la digitonine un peu moins pure. La natigine réagit tout aussi bien avec les stérols et permet d'en opérer le dosage par formation d'un complexe semblable à celui que l'on obtient avec la digitonine.

On dissout la natigine dans de l'alcool à 80° bouillant, et l'on verse cette solution bouillante dans la solution alcoolique d'insaponifiable portée elle-même à ébullition. Il se forme un complexe blanc nacré, cristallin insoluble au bout de une heure de séjour au bain-marie à 80°. Ce complexe est recueilli, lavé d'abord à l'alcool à 95° ensuite à l'éther, puis séché et pesé. Le poids trouvé, multiplié par le coefficient 0,26 (qui est le rapport des poids moléculaires de la natigine et du complexe) donne le poids en grammes de stérols contenus dans la prise d'essai.

Avec la digitonine on utilise l'alcool à 95°, le complexe se forme bien au refroidissement à la température ambiante mais demande plusieurs heures pour apparaître. Il est aussi lavé à l'alcool et à l'éther, puis séché et pesé. Le poids trouvé est ici multiplié par le coefficient 0,24 pour obtenir le poids de stérols contenus dans la prise d'essai.

Nous avons fait le dosage des stérols sur les substances insaponifiables de l'huile de Colza de Suède et de l'huile de Navette dite « Lanskrona » en provenance du département d'Eure-et-Loir, déjà citées.

Les résultats sont donnés dans le tableau suivant :

TABLEAU VII

	Poids de stérols pour 100 g d'insaponifiable	Poids de stérols pour 100 g d'huile	
Colza de Suède			
Huile de *pression*			
Insaponifiable éther	19,6	0,16	
Huile *d'extraction*			
Insaponifiable éther	27,2	0,26	
Navette Lanskrona			
Huile de *pression*			
Insaponifiable éther de pétrole	20,0	0,09	0,20
Insaponifiable obtenu par un traitement supplémentaire de la solution savonneuse à l'éther ordinaire	20,0	0,11	
Insaponifiable extrait uniquement par l'éther ordinaire	18,7	0,19	
Navette Lanskrona			
Huile *d'extraction*			
Insaponifiable extrait à l'éther de pétrole	22,1	0,22	0,43
Insaponifiable obtenu par traitement supplémentaire de la solution savonneuse à l'éther ordinaire	25,0	0,21	
Insaponifiable extrait uniquement par l'éther ordinaire	20,3	0,38	

L'insaponifiable résistant étant trop peu abondant, nous n'avons

pas pu faire un dosage précis, bien que nous ayons eu un léger précipité dans la liqueur ; ceci prouve seulement l'existence d'une faible quantité de stérols dans cet insaponifiable.

La lecture des résultats ci-dessus met en évidence une teneur en stérols environ deux fois plus forte pour les huiles d'extraction que pour les huiles de pression.

DOSAGE DES CAROTÈNES

Signalons enfin, que les substances insaponifiables des huiles d'extraction sont généralement de couleur rouge-orangé plus foncée que celles des huiles de pression ; ce fait est imputable sans doute à une teneur plus élevée en pigments caroténoïdes.

Nous avons voulu vérifier cette hypothèse en dosant le carotène de ces substances insaponifiables, à l'aide du Spectrophotomètre de BECKMANN (1).

La courbe obtenue représente la quantité de lumière absorbée par la solution caroténée d'insaponifiable. Cette quantité de lumière absorbée, désignée par le terme de « densité optique » varie avec la longueur d'onde de la lumière utilisée, la concentration de la solution en carotène et le solvant employé.

L'insaponifiable étudié contient, sans doute, plusieurs pigments caroténoïdes ; la courbe obtenue ne représente donc que la résultante de la quantité de lumière absorbée par les différents pigments caroténoïdes ; cependant les deux maxima obtenus sont caractéristiques du β carotène ; nous avons utilisé le chloroforme comme solvant, or le maximum supérieur de la courbe est caractéristique du β carotène en solution chloroformique pour la longueur d'onde de 455 mμ.

Dans le cas particulier où l'on aurait une solution chloroformique de β carotène pur, un maximum de densité optique de 0,240 pour une lumière de longueur d'onde 455 mμ indique une concentration en β carotène, de 1 γ par cc de solution.

Nous avions à notre disposition 0,120 g d'insaponifiable d'huile de pression de Colza de Suède ; ils ont été dissous dans 15 cc de chloroforme, puis 2 cc de cette solution ont été dilués à 25 cc avec du chloroforme. La courbe obtenue avec le spectrophotomètre présente un maximum de densité optique de 0,285 pour la longueur d'onde de 455 mμ.

La solution chloroformique d'insaponifiable contient alors :

$$\frac{0{,}285}{0{,}240} = 1{,}18\ \gamma$$ de carotène par cc de solution.

(1) Nous devons à l'amabilité du service chimique de l'Institut pour les huiles et oléagineux (IRHO) d'avoir pu faire ces dosages de caroténoïdes et nous lui en exprimons nos sincères remerciements.

En tenant compte des dilutions successives on obtient :

$$1{,}18 \times \frac{25}{2} \times 15 = 221{,}2\ \gamma = 0{,}221 \text{ mg de carotène dans } 120 \text{ mg}$$

d'insaponifiable, soit : $\frac{0{,}221 \times 100}{120} = 0{,}18$ p. 100.

Ce résultat exprime les caroténoïdes totaux en β carotène.

Nous avons opéré de même sur l'insaponifiable d'huile d'extraction du même Colza de Suède ; nous étions en possession de 0,200 g d'insaponifiable ; ils ont été dissous dans 15 cc de chloroforme, puis 2 cc de la solution obtenue ont été dilués à 25 cc et 2 cc de cette nouvelle solution dilués à 4 cc avec du chloroforme afin d'obtenir une concentration convenable.

La courbe d'absorption donne un maximum de densité optique de 0,425 pour la longueur d'onde de 455 mμ.

La solution chloroformique d'insaponifiable contient alors :

$$\frac{0{,}425}{0{,}240} = 1{,}77\ \gamma \text{ par cc.}$$

En tenant compte des dilutions successives on obtient :

$$1{,}77 \times 2 \times \frac{25}{2} \times 15 = 663{,}7\ \gamma = 0{,}663 \text{ mg, soit : } \frac{0{,}663 \times 100}{200}$$

$= 0{,}33$ p. 100.

Comme ci-dessus, ce résultat exprime les caroténoïdes totaux en β carotène.

Nous avons essayé de faire le même travail sur l'insaponifiable résistant de l'huile de pression de Colza de Suède. La courbe obtenue est une hyperbole et ne présente pas de maximum, ce qui donne à penser que cet insaponifiable ne contient pas de carotène, lequel a dû être complètement extrait de la solution savonneuse par l'éther ordinaire.

V. — CONCLUSIONS

Il ressort de cette modeste étude que le dosage des substances insaponifiables est loin d'être aussi précis qu'on pourrait le penser ; les méthodes recommandées par la Commission Internationale ne donnent pas un chiffre rigoureux. Bien que la méthode à l'éther ordinaire, appliquée avec soin, donne des résultats assez constants, elle est entachée cependant d'une erreur par défaut.

En appliquant les techniques décrites, nous avons pu scinder les substances insaponifiables en trois fractions : 1° des substances que l'on peut extraire avec l'éther de pétrole, 2° des substances non extractibles par l'éther de pétrole, mais qui peuvent être extraites par l'éther ordinaire, 3° des substances résistant à ces traitements, mais que l'on peut récupérer en précipitant les savons à l'état de savons de baryum. Toute-

fois on peut diminuer l'importance de cette troisième fraction en modifiant le mode opératoire comme nous l'avons indiqué.

Étant donné les différences qui existent entre les diverses substances insaponifiables que nous avons obtenues, nous pensons que ce fractionnement préalable peut faciliter l'isolement et l'étude de leurs principes constituants.

Reçu pour publication le 1er *mars* 1956.

ÉTUDE DE LA MATURATION DE L'ABRICOT (var. CANINO) AU MAROC, EN VUE DE LA MISE EN CONSERVE

PAR

A. PATRON, H. SWINZOW et F. MICHEL

Laboratoire de Technologie de l'Institut des Fruits et Agrumes coloniaux, au Maroc.

PLAN DU MÉMOIRE

Introduction.

I. — Evolution chimique et physique au cours de la maturation.

A. — Organisation des essais.
1° Matière première.
2° Méthode de prélèvement.
3° Méthodes d'analyse.

B. — Résultats.
1° Adhérence du noyau ; solidité de l'insertion, couleur globale et poids des fruits.
2° Couleur et dureté.
3° Extrait sec, acidité, rapport Er/A.
4° Sucres, acide ascorbique.
5° Autres constituants et pH.

II. — Essais pratiques de fabrication de conserves appertisées.

A. — Méthodes et matériel.
B. — Résultats.

III. — Discussion.

1° Critères de maturité.
2° Application des résultats à la mise en conserves.
3° Utilisations de l'abricot en fonction du degré de maturité.

Résumé et conclusions.

On sait que chez l'abricot, la phase finale de maturation est extrêmement rapide, comparée à celle de beaucoup d'autres fruits. C'est généralement l'affaire de quelques jours.

La rapidité de cette évolution, la difficulté de trouver une main-d'œuvre suffisante pour la cueillette industrielle, et aussi la crainte que

des conditions climatiques sévères (sirocco) ne viennent encore hâter la maturation, font que les récoltes sont parfois effectuées à un moment où les fruits sont encore loin d'avoir atteint une coloration et un degré général d'évolution compatible avec la fabrication de conserves de bonne qualité.

D'une façon générale, l'état de maturité est reconnu plus ou moins empiriquement.

Les travaux sur la maturation de l'abricot sont peu nombreux. Il convient de mentionner celui de PAVLENKO (1) qui fait ressortir de larges variations dans la composition chimique de ce fruit en fonction des facteurs climatiques, mais comme cette étude n'a pas été faite du point de vue technologique, les résultats ne peuvent être comparés aux nôtres qu'en ce qui concerne l'allure générale des phénomènes.

BOHART (2) a déterminé la composition chimique de l'abricot en vue de son utilisation en conserverie, mais s'est borné à deux stades dits « vert » et « mûr », sans compléter son travail par des essais pratiques.

Il a donc paru utile d'étudier l'évolution des fruits sur l'arbre pendant une période assez étalée afin de rechercher des critères de maturité pouvant éventuellement servir à définir le moment optimum de la cueillette en vue de la conserve, ou encore les utilisations possibles d'un lot donné, déjà cueilli (fruits au naturel — fruits au sirop — pulpes — confitures).

Ce travail se divise donc naturellement en deux parties :

1° l'étude de l'évolution des fruits sur l'arbre et la définition aussi objective que possible de leur état de maturité ;

2° la fabrication expérimentale de conserves à partir de lots de maturité définie.

I. — ÉVOLUTION CHIMIQUE ET PHYSIQUE AU COURS DE LA MATURATION

A. — ORGANISATION DES ESSAIS

1° Matière première

a) Variété. — Terroir

Les fruits provenaient du domaine de Sidi Larbi appartenant à la Compagnie Marocaine, entre Casablanca et Boulhaut, donc dans la zone côtière atlantique du Maroc. Un rectangle de 12 arbres a été délimité afin que les prélèvements soient toujours effectués sur les mêmes sujets.

b) **Facteurs climatiques**

Il ne faut pas oublier que le climat de la zone côtière au Maroc est sensiblement différent de celui qui règne. à Marrakech Or c'est la région de Marrakech qui constitue la zone de grande production de l'abricot.

Afin de mieux situer le problème, il a donc paru nécessaire de rapporter le régime des températures et des pluies qui ont présidé au développement des fruits ou accompagné leur maturation. Le Tableau I indique les températures maxima et minima et les précipitations au cours des six premiers mois de l'année, tandis que la Figure I donne

TABLEAU I

Températures moyennes et précipitations
Au cours des mois de janvier à juin
(Domaine de Sidi Larbi)

MOIS	Températures		Précipitations (en mm)
	Max.	Min.	
Janvier	19°0	9°5	125,1
Février	19°6	9°0	101,2
Mars	19°7	8°3	103,0
Avril	24°1	9°3	16,7
Mai	27°6	12°6	1,3
Juin	30°2	15°6	2,7

les courbes des températures maxima et minima, ainsi que les précipitations pendant la période finale de maturation (du 20 mai au 13 juin).

On constate que les pluies ont été abondantes et les températures stables en janvier, février et mars, tandis qu'avril a marqué un arrêt assez brusque des précipitations et une hausse sensible des maxima de température.

Les températures qui ont présidé à la maturation des fruits ont été relativement stables, comme on peut s'en convaincre d'après la Figure I. Enfin la chute de pluie du 8 juin mérite d'être signalée.

2° **Méthode de prélèvement**

Les prélèvements étaient effectués le matin à raison de trois abricots par arbre, dans trois directions différentes, en choisissant les fruits d'une grosseur et d'une maturité apparente aussi identiques que possible, de façon à constituer un lot homogène de 36 fruits.

Ce lot était aussitôt transporté au laboratoire en vue de l'analyse. Il subissait alors un triage à vue, de façon à éliminer les quelques fruits

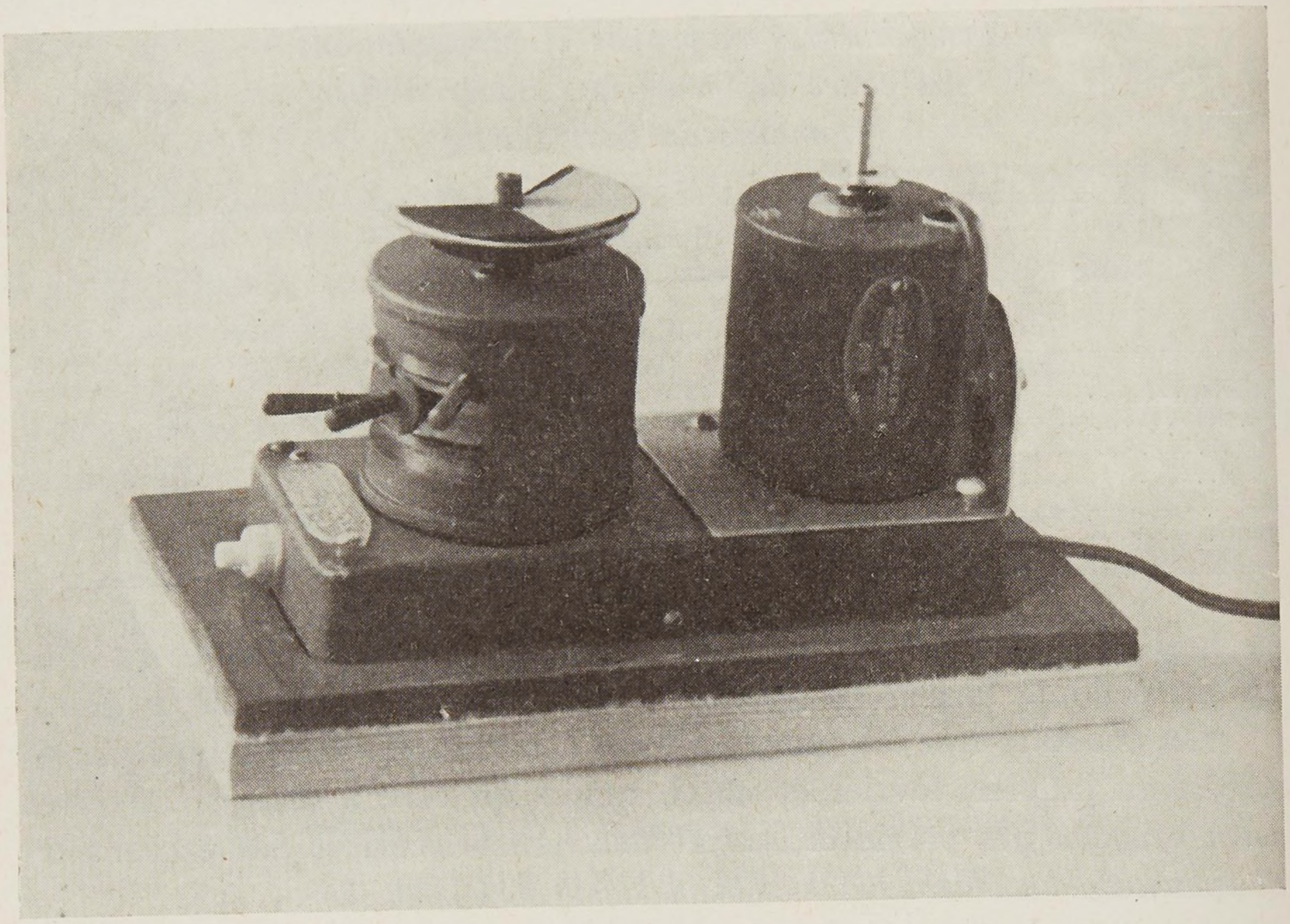
dont la grosseur ou l'apparence pouvait s'écarter sensiblement de celle des autres fruits du lot par suite d'une inattention de l'opérateur.

En fait on n'éliminait jamais guère plus de deux ou trois fruits par lot.

3° Méthode d'analyse

a) Couleur

Dès 1946, ULRICH (3) préconisait l'emploi de la méthode des disques tournants pour apprécier la couleur des fruits. La couleur était déterminée au moyen du comparateur à disques tournants (1) décrit par



CLICHÉ n° 1. — Comparateur de couleur à disques tournants, système DUPAIGNE (ROZE constructeur). Les manettes situées en avant permettent de faire varier la position relative de quatre disques colorés en cours de rotation ; la couleur résultante varie ainsi d'une façon continue.

DUPAIGNE (4) qui permet de faire varier la proportion relative de quatre secteurs colorés en cours de rotation, ce qui augmente la précision et la fidélité des résultats (cliché n° 1).

Les teintes des disques colorés ayant été déterminées empiriquement à la suite de nos précédents travaux sur l'abricot (5), il fallut trouver, dans le commerce, des couleurs répondant à nos besoins et préparer les disques.

(1) Rozé, constructeur, 29, rue de la Fontaine-au-Roi, Paris.

Pratiquement nous avons utilisé les couleurs à l'huile suivantes :

— *pour le disque jaune* : le « Jaune de Cadmium Citron » de A. DROUANT (Paris), au sulfure de cadmium ;

— *pour le disque rouge* : le « Rouge de Cadmium » de LEFRANC, « M », au sélenio-sulfure de cadmium ;

— *pour le disque vert* : le « Vert Emeraude » de LEFRANC, « M », à l'oxyde de chrome hydraté.

— le quatrième disque était *blanc* (bristol aussi blanc que possible).

Une certaine proportion de blanc s'avéra en effet nécessaire.

Ce sont ces quatre couleurs dont le mélange en proportions variées, par rotation d'un disque composite, nous a fourni les meilleurs résultats dans le cas de l'abricot ; cela n'implique pas nécessairement que nous recommandons les marques citées plutôt que d'autres que l'on peut également se procurer dans le commerce et donnant les mêmes teintes, soit directement, soit par mélange. Voici d'ailleurs la référence de ces teintes dans les trois « Dictionnaires de couleurs » :

Ouvrage	Jaune	Rouge	Vert
Seguy (6)	Intermédiaire entre les nº 241 286	Nº 91	Voisin du nº 401, mais non identique
Wilson (7)	I (Jaune soufre)	717 (Rouge ponceau)	n'existe pas.
Maerz & Paul (8)	*17*-L-1	*l*-L-11 (Rouge chinois)	voisin du *31*-L-12 mais non identique.

Dans la suite de ce travail, les couleurs sont donc définies en pourcentage de chacune des quatre teintes citées, chaque pourcentage étant proportionnel à l'angle du secteur considéré, par exemple, un angle de 90º du secteur rouge se traduira par : « 25 p. 100 de rouge ».

Pour la mesure on ne tient compte que de la teinte dominante, ou teinte de fond de l'épiderme des fruits, et non des zones relativement moins importantes teintées de vert d'un côté du fruit ou de rouge sur l'autre face.

Les pourcentages de chacune des quatre couleurs furent mesurés sur cinq fruits, et les moyennes calculées. Ce sont ces moyennes qui figurent dans la Figure 1.

Accessoirement, le rapport $\frac{\text{Rouge}}{\text{Jaune}}$ fut calculé, comme critère de maturité.

b) **Dureté**

La dureté fut déterminée au moyen d'un pénétromètre (3) du type « Bellevue » (1) muni d'un embout de 3,19 mm de diamètre et de 7,9 mm

(1) S. E. T. I. F., constructeur, 17, rue de Clichy, Paris.

de long et d'un ressort nécessitant une force de 1,600 kg environ pour amener l'appareil à la division 100. La section de cet embout est de 8 mm² ; elle convient mieux pour les fruits peu mvrs que pour les fruits bien mûrs.

Les résultats ont été rapportés en kg/cm². Il faut toutefois se garder de transposer dans le même système d'unités les résultats obtenus avec des embouts de dimensions différentes car il n'y a pas de proportionnalité.

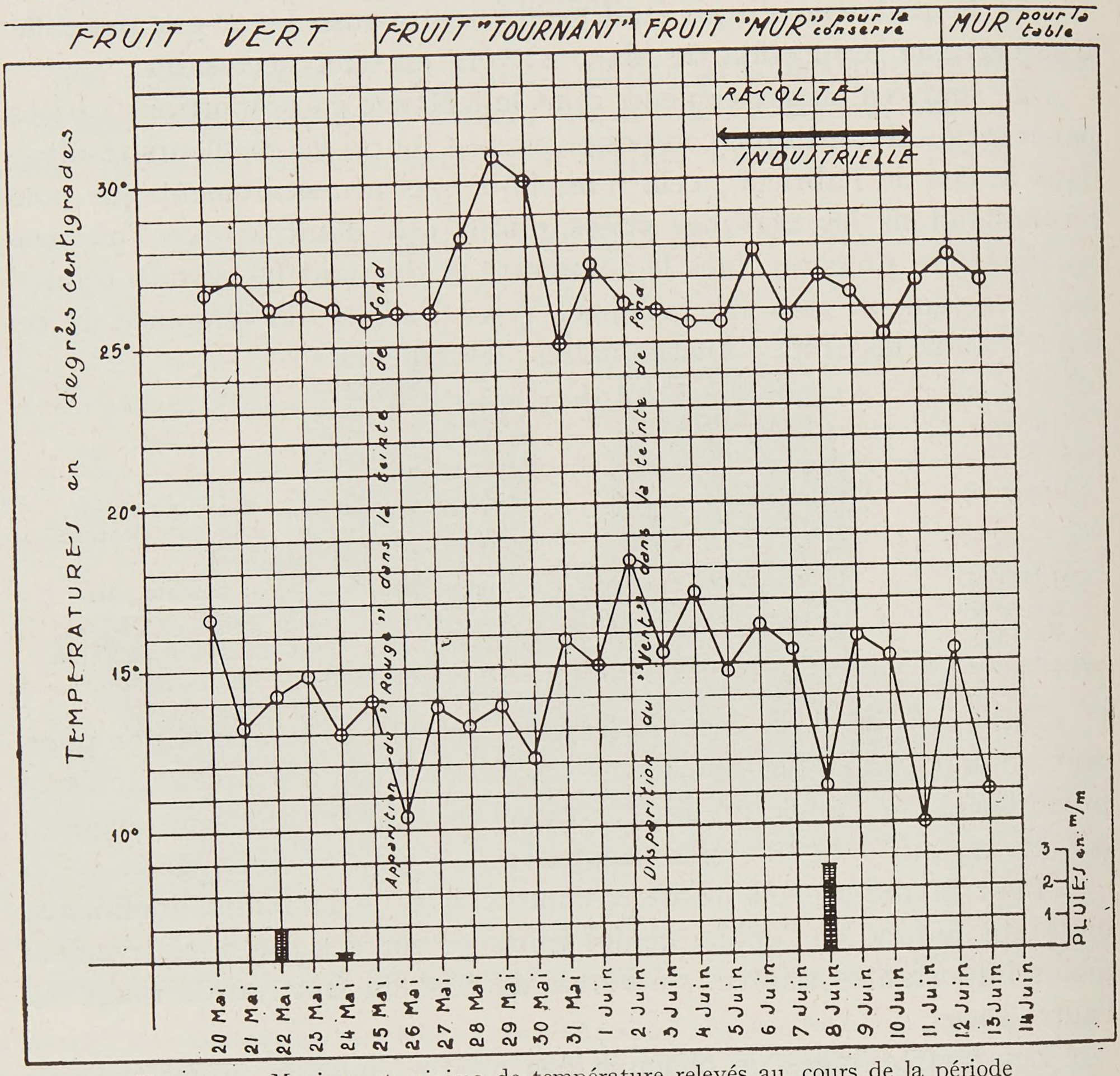


FIG. 1. — Maxima et minima de température relevés au cours de la période de maturation des abricots Canino. Pluies. (Domaine de Sidi-Lardi).

La mesure nécessite l'enlèvement de l'épiderme sur 1 cm² environ, au moyen d'un couteau bien tranchant. Pour chacun des cinq fruits dont on vient de déterminer la couleur, on effectue trois mesures, en trois points différents, ce qui fournit 15 mesures dont on fait la moyenne.

c) **Préparation de l'échantillon en vue de la détermination de l'extrait sec, l'extrait réfractométrique, l'acidité, les sucres, les pectines et les cendres**

Pour cette détermination, on prend 30 à 35 fruits que l'on coupe en quatre quarts (le noyau étant éliminé) et dont on retient un quartier

au hasard. Les trente quartiers représentant le lot sont broyés pendant une minute, à grande vitesse, dans un Turmix, après addition de 40 à 60 milligrammes de thiourée. Cette addition a pour but d'empêcher l'action des oxydases, c'est-à-dire le brunissement du produit. Elle ne modifie l'extrait sec que d'une quantité tout à fait négligeable, car le poids de l'échantillon total est de l'ordre de 250 grammes.

On obtient ainsi un *échantillon A*.

d) **Extrait sec à l'étuve**
(**méthode de Cheftel, Frichet et Estang** (9), **modifiée**)

On sèche à l'étuve à 100°C et on tare une capsule d'aluminium de 50 mm de diamètre, munie d'un couvercle et dans laquelle on a placé un disque de papier filtre gaufré. On pèse avec précision 8 à 10 grammes du produit broyé A., dans la capsule que l'on introduit dans l'étuve à 100°C, en surveillant étroitement la marche de la dessiccation. Le produit qui ne doit pratiquement pas changer de couleur, ni à plus forte raison caraméliser pendant ce passage à l'étuve à 100°C (qui est de l'ordre de deux heures), est alors retiré avant complète dessiccation, puis placé dans une étuve de Chopin (1), sous vide réglée à 70°C. La dessiccation est alors achevée à cette température sous une pression ne dépassant pas 20 mm de mercure pendant trois heures. On prend soin de ménager une petite arrivée d'air sec par les deux robinets situés sur les portes de l'étuve. Au bout de ce temps, les capsules sont sorties de l'étuve, refermées et pesées après refroidissement complet au dessiccateur.

e) **Extrait réfractométrique**

Quelques centimètres cubes de l'échantillon A sont pressés à la main dans une mousseline à beurre afin d'en exprimer une ou deux gouttes qui sont examinées au moyen d'un réfractomètre à main, gradué en degrés Brix.

f) **pH**

On le détermine sur le jus exprimé de la même façon que pour l'extrait réfractométrique, au moyen d'un stato-sörensenmètre à électrode de verre (2).

g) **Acidité**

On pèse 5 g de l'échantillon A que l'on dilue avec environ 50 cm^3 d'eau distillée exempte de gaz carbonique et on titre au moyen de soude décinormale en présence de trois gouttes de phénolphtaléine à 1 p. 100,

(1) Chopin, constructeur, 5, rue Escudier, Boulogne-sur-Seine.
(2) Brewer, constructeur, 76, boulevard St Germain, Paris.

jusqu'au virage rose franc. Les résultats sont exprimés en g d'acide citrique hydraté à une molécule d'eau pour 100 g de pulpe comestible.

h) **Sucres**

On pèse 5 g de l'échantillon A que l'on introduit dans une fiole jaugée de 100 cm^3 avec de l'eau distillée (environ 50 cm^3). On ajoute 4 cm^3 de ferrocyanure de potassium à 15 p. 100 et 4 cm^3 d'acétate de zinc à 23 p. 100, en agitant, et on laisse reposer 15 minutes. On complète au trait de jauge, et on filtre après agitation. Sur le filtrat, on dose les sucres réducteurs et les sucres totaux, après hydrolyse, selon la méthode de BERTRAND. Pour l'hydrolyse, on prélève 25 cm^3 du filtrat qu'on introduit dans une fiole de 50 cm^3 et on ajoute 1 cm^3 d'acide chlorhydrique dilué au 1/2 (densité 1,100). Les résultats sont exprimés en g de glucose pour 100 g de pulpe comestible.

i) **Pectines (Méthode de Carré et Haynes, modifiée par Hinton** (10)

On pèse 100 g de l'échantillon A dans une fiole conique de 2 l, à, large ouverture ; puis on ajoute 700 cm^3 d'eau distillée et on fait bouillir pendant une heure. Le liquide est alors refroidi et son volume ajusté à 1 000 cm^3 dans une fiole jaugée. On agite et on filtre sur filtre plissé de grande dimension. On prélève 100 cm^3 du filtrat qu'on introduit dans un bécher à forme haute de 600 cm^3 ; on ajoute 150 cm^3 d'acétone pure en agitant et on continue le dosage suivant la méthode de CARRÉ et HAYNES, dont on trouvera également le texte dans un bulletin de CHEFTEL (11).

j) **Cendres**

Dans une capsule de porcelaine préalablement séchée et calcinée refroidie et tarée, on pèse 15 à 20 g de l'échantillon A. On sèche à l'étuve à 100°C jusqu'à caramélisation et on incinère au four électrique réglé à 550°C environ, jusqu'à ce que les cendres obtenues ne présentent plus de points ou de taches noires. On pèse après refroidissement complet au dessiccateur. On porte à nouveau la capsule au four électrique pendant une heure, afin de vérifier qu'il n'y a plus de perte de poids.

k) **Calcium**

Le calcium est dosé dans les cendres par précipitation sous forme d'oxalate et l'acide oxalique libéré est titré par manganimétrie.

1° Préparation de l'échantillon en vue de la détermination de l'acide ascorbique et dosage

Trente à trente-cinq quarts de fruits, provenant chacun d'un abricot, sont pressés et introduits dans le bol du Turmix. On ajoute un poids égal d'une solution glacée d'acide oxalique à 5 p. 100 dans l'eau bidistillée, et 40 à 60 mg de thiourée ; le tout est broyé à grande vitesse pendant une minute. On obtient alors une bouillie qui constitue l'échantillon B. On pèse exactement 5 g de cette bouillie dans un bécher de 50 cm^3, qu'on transvase dans une fiole d'ERLENMEYER de 200 cm^3 en rinçant le bécher avec de l'eau bidistillée de façon à amener le volume à environ 100 cm^3.

On titre alors la solution au moyen d'une solution de dichlorophénol-indophénol selon la méthode classique (12).

B. — RÉSULTATS

1° Adhérence du noyau, solidité de l'insertion, couleur globale et poids des fruits

Diverses remarques faites au moment de la cueillette ou de la préparation de l'échantillon sont présentées dans le Tableau II.

L'adhérence du noyau a constitué la première manifestation sensible de la maturation, avec le virage de la couleur de fond, qui était d'ailleurs encore difficile à reconnaître à ce stade (27-29 mai). Brusquement, le noyau devient plus facile à détacher de la chair ; un vide va même se créer peu à peu.

La *couleur* n'a été notée ici qu'en fonction de la proportion de « vert », à la surface du fruit. Cette notation est nécessairement assez vague, mais elle sera complétée plus loin par l'analyse au moyen des disques tournants. On voit cependant que des traces de vert ont subsisté jusqu'à un stade très avancé de la maturation (11 juin).

La *solidité de l'insertion,* qui a diminué notablement quelques jours après l'amoindrissement de l'adhérence du noyau (31 mai et 1er juin) fut beaucoup plus caractéristique de l'évolution des fruits. Dès le 3 juin les fruits pouvaient être détachés par une traction minime. Nous verrons plus loin que c'est à partir de cette époque que les fruits paraissaient commencer à convenir à la mise en conserve, bien qu'ils fussent encore loin d'être « mûrs ».

Il semble que le *poids moyen* des fruits n'ait pas varié de façon sensible au cours de la période pendant laquelle on a étudié l'évolution au moins dans la limite des variations individuelles auxquelles il fallait s'attendre en raison de la faiblesse de l'échantillon prélevé (30 à 35 fruits) ainsi qu'on le voit dans le Tableau III.

Tableau II

Solidité de l'insertion, couleur générale et adhérence du noyau des fruits soumis à l'analyse

Date de cueillette	Remarques diverses			Date de cueillette	Remarques diverses		
	Insertion	Couleur	Noyau		Insertion	Couleur	Noyau
23 Mai	S_1	C_1	A	3 Juin	S_4	C_2	B
25 —	»	»	»	6 —	»	»	»
27 —	»	»	»	8 —	»	»	»
29 —	»	»	B	9 —	»	»	»
30 —	»	»	»	9 —	»	»	»
31 —	S_2	C_2	»	11 —	»	C_3	»
1 Juin	S_3	»	»	13 —	»	»	»
2 —	»	»	»	13 —	»	»	»

Légende. — A : Noyau adhérent. — B : Le noyau se détache ; il deviendra de plus en plus « libre » au cours du temps. — C_1 : Fruits verts sur plus du quart de leur surface. — C_2 : Les fruits ne présentent plus que de faibles traces de vert sur moins du quart de leur surface ; une de leurs faces est bien colorée. — C_3 : Fruits bien colorés ; absence de vert. — S_1 : Insertion très solide ; il faut exercer une traction notable pour cueillir le fruit. — S_2 : La solidité de l'insertion diminue beaucoup pour environ 50% des fruits. — S_3 : La solidité de l'insertion devient faible chez presque tous les fruits. — S_4 : La solidité de l'insertion est très faible ; il suffit d'un effort minime pour détacher les fruits de l'arbre.

2° Couleur et dureté

La composition de la *couleur de fond*, analysée au moyen des disques tournants vert, jaune, rouge et blanc, est schématisée dans la Figure 2 en fonction de l'indice de maturité $\frac{Er}{A}$ (voir plus loin).

Cette représentation rend plus sensible le virage de la couleur qui se produit entre le moment où l'abricot est entièrement vert (25 mai) et celui où il a pratiquement acquis sa teinte de fond définitive (entre le 3 et le 9 juin) ; son indice de maturité est alors compris entre 7,0 et 8,0 et situe l'état de maturité d'une manière plus précise que la date de cueillette. Il est en effet apparent qu'entre le 2 juin et le 11 juin, l'ordre des dates de cueillette semble bouleversé par rapport à celui des indices de maturité, sans doute parce qu'on s'efforçait de toujours recueillir des lots aussi homogènes que possible. La date de cueillette n'est donnée dans la Figure 2 qu'à titre documentaire, mais ne présente pas de signification importante.

Dans l'ensemble, on peut discerner au moins trois phases dans l'évolution de la couleur (fig. 2) :

1° *Rapport Er/A inférieur à 4,0.* — Le Rouge est pratiquement absent dans la composition de la teinte de fond qui ne se compose que de Jaune, de Vert et de Blanc. Ceci ne veut pas dire que la face exposée au soleil ne présente pas une pigmentation Rouge.

2° *Rapport Er/A compris entre 4,0 et 7,5.* — Le Rouge fait son appa-

rition dans la teinte de fond et remplace assez rapidement le Vert ; accessoirement, le Jaune diminue également au bénéfice du Rouge. *C'est la phase tournante.*

3° *Rapport Er/A plus grand que 7,5.* — Le Vert est pratiquement absent de la teinte de fond qui ne se compose plus que de Jaune, de Rouge et de Blanc, ce qui ne signifie pas qu'il ne subsiste plus de traces

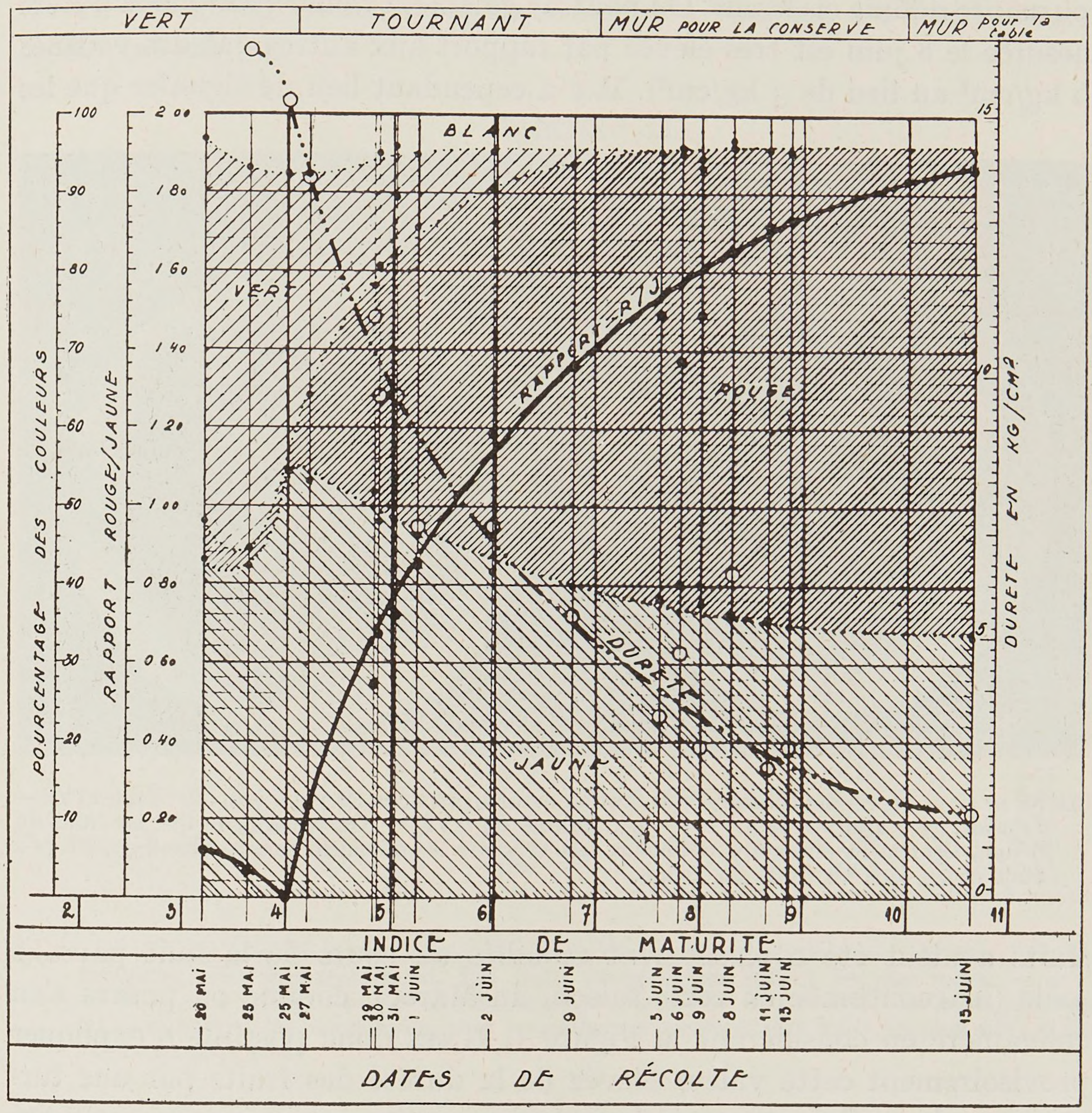


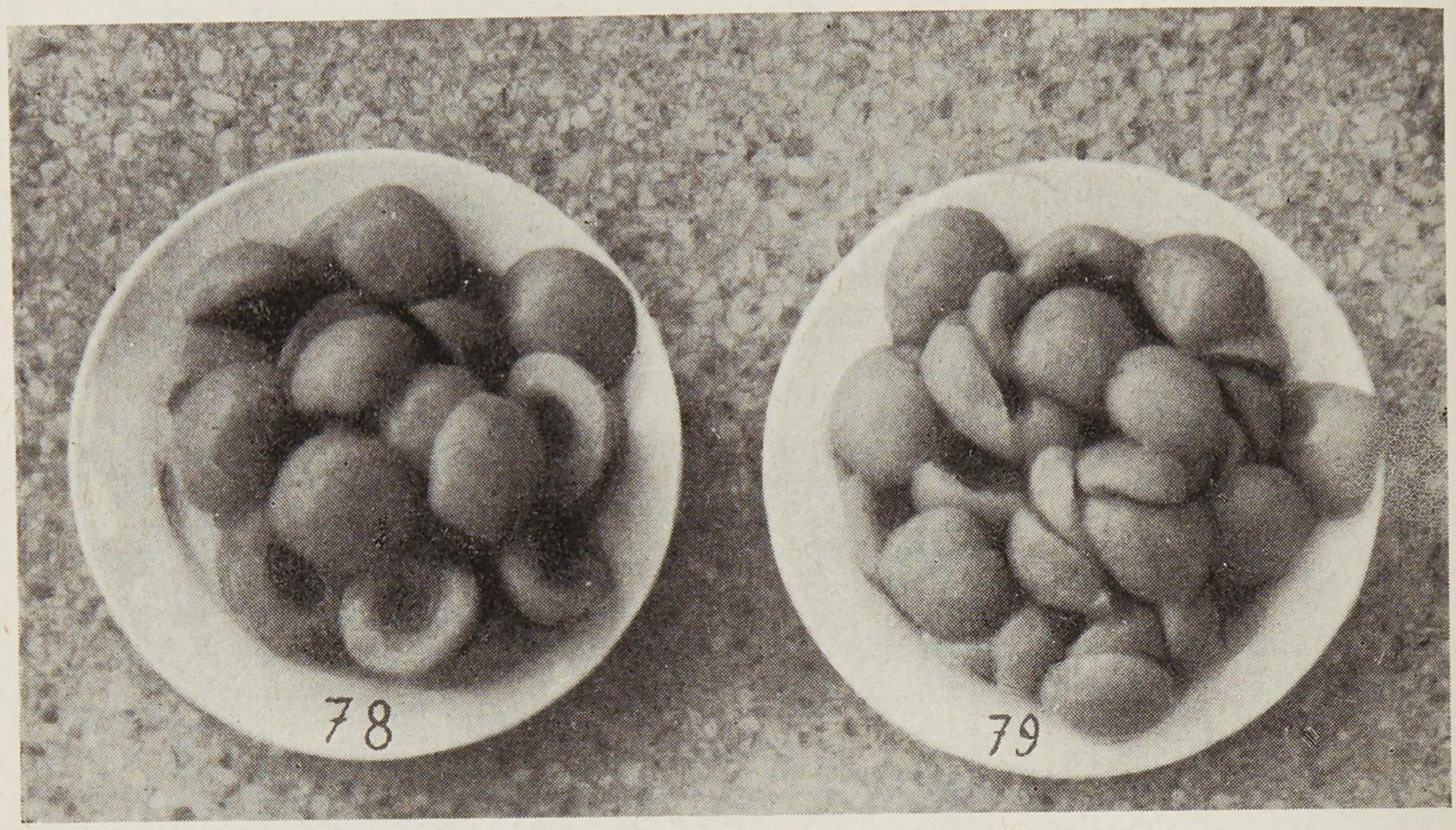
FIG. 2. — Évolution de la couleur et de la dureté au cours de la maturation des abricots.

de Vert en un certain endroit de la surface du fruit. A partir de ce moment, la composition de cette teinte de fond ne change plus beaucoup, quoique le Rouge gagne encore un peu sur le Jaune, mais le fruit n'est *pas encore complètement mûr* ; nous verrons plus loin qu'il est cependant utilisable en conserverie.

Le rapport Rouge/Jaune (R/J), dont la courbe a été tracée dans la Figure 2 évolue constamment entre 0 et 1,86. C'est seulement lorsqu'elle atteignait une valeur voisine de 1,80 (correspondant à un indice de matu-

rité de l'ordre de 10,0) que le fruit avait atteint sa maturité dite « de table ».

Enfin, toujours dans la Figure 2, on a représenté les variations de la dureté des fruits, exprimée en kg par cm^2. Elle diminue constamment et en raison inverse de la valeur du rapport R/J. C'est surtout la dureté ou fermeté des fruits qui conditionne leur utilisation en conserverie. On notera que la chute de la dureté est très brutale pendant la phase tournante définie ci-dessus. On pourra également remarquer que la dureté mesurée le 8 juin est très élevée par rapport aux autres valeurs voisines (6 kg/cm^2 au lieu de 3 kg/cm^2). Il y a cependant lieu de signaler que les



Cliché n° 2. — Aspect des conserves d'abricot au naturel, préparées les 3 et 6 juin (cf. : Tableau V). — *Légende :* 78 : abricots du 3.VI. — 79 : abricots du 6.VI. — On remarquera que les fruits du 6 juin, légèrement plus mûrs, ont moins bien supporté le traitement sans préchauffage, tel qu'il était conçu, que les fruits du 3 juin.

fruits avaient été copieusement mouillés au cours de la nuit par une pluie (inaccoutumée en cette saison, au Maroc), comme on pourra s'en convaincre en considérant la Figure 1. Il est donc possible d'expliquer provisoirement cette valeur élevée de la dureté des fruits par une turgescence des cellules et ce phénomène pourrait sans doute être exploité utilement en conserverie. A l'exception de cette valeur aberrante du 8 juin, la dureté et le rapport $\frac{R}{J}$, présentent une corrélation très satisfaisante.

3° Extrait sec, acidité, rapport Er/A

Le Tableau III contient les résultats des déterminations de l'extrait sec, par les deux méthodes décrites au chapitre précédent, et de l'acidité des fruits, en regard de la date de cueillette. Les deux chiffres représentant

l'extrait sec tendent à se rapprocher vers la fin de la maturation, quoique le réfractomètre donne toujours une valeur inférieure (« extrait soluble ») à celle qu'on obtient à l'étuve. Il est apparent que les fruits continuent à s'enrichir en matières solides jusque dans les toutes dernières phases de l'évolution, tandis que l'acidité ne cesse de décroître au cours de la maturation. Il faut noter cependant qu'elle demeure assez élevée jusqu'à la fin des observations, comparativement à l'acidité des fruits récoltés à Marrakech (5).

Tableau III

Poids moyen ; extrait sec, acidité, et indice de maturité des fruits analysés

Date de cueillette	Poids moyens des fruits (lots analysés) g	Extrait sec à l'étuve (à 70°C) (sous vide)	Extrait réfractométrique Er	Acidité citrique p. 100	Indice de maturité $\frac{Er}{A}$
20 Mai	—	—	10,4	3,22	3,20
23 —	—	—	11,4	3,14	3,63
25 —	—	13,90	12,4	3,10	4,00
27 —	39,4	15,40	13,2	3,14	4,20
29 —	39,6	15,35	14,2	2,94	4,83
30 —	37,4	16,23	14,4	2,95	4,87
31 —	39,5	16,35	14,6	2,90	5,04
1 Juin	40,6	16,45	15,0	2,86	5,25
2 —	39,0	—	16,3	2,73	5,97
3 —	42,6	19,20	17,8	2,34	7,60
6 —	41,0	18,90	18,1	2,32	7,80
8 —	38,4	19,63	18,6	2,24	8,30
9 —	39,0	19,10	17,4	2,58	6,75
9 —	51,0	18,53	17,1	2,14	8,00
11 —	37,2	20,20	18,7	2,16	8,65
13 —	32,8	21,90	20,0	2,26	8,85
13 —	36,9	21,82	20,4	1,92	10,63

Nota. — 1° Le 9 juin, on a trié *par grosseur* des fruits de couleur sensiblement identique, en deux catégories analysées séparément. Les fruits les plus gros étaient les plus mûrs. — 2° Le 13 juin, on a trié *par couleur* et fermeté (appréciées à l'œil et à la main) les fruits paraissant les plus mûrs et les moins mûrs, pour les analyser séparément. Les fruits les plus mûrs étaient encore les plus gros.

Le rapport $\frac{Er}{A}$, souvent utilisé comme « indice de maturité » des fruits, a été calculé en utilisant volontairement l'extrait réfractométrique, beaucoup plus facile à déterminer que l'extrait à l'étuve. On voit qu'il augmente constamment entre 3,2 et 10,6 au cours de la maturation. C'est ce rapport qui va servir de base pour l'établissement des graphiques suivants. Il est apparu, en effet, que les courbes présentaient de cette façon un aspect plus régulier qu'en utilisant les dates de cueillette.

4° Sucres, acide ascorbique

On a groupé dans la Figure 3 les courbes représentant les variations des principaux constituants des fruits, en fonction de l'indice Er/A.

Il est facile de constater que les abricots ne cessent de s'enrichir en sucres, notamment en *saccharose* et en *acide ascorbique*, jusqu'au mo-

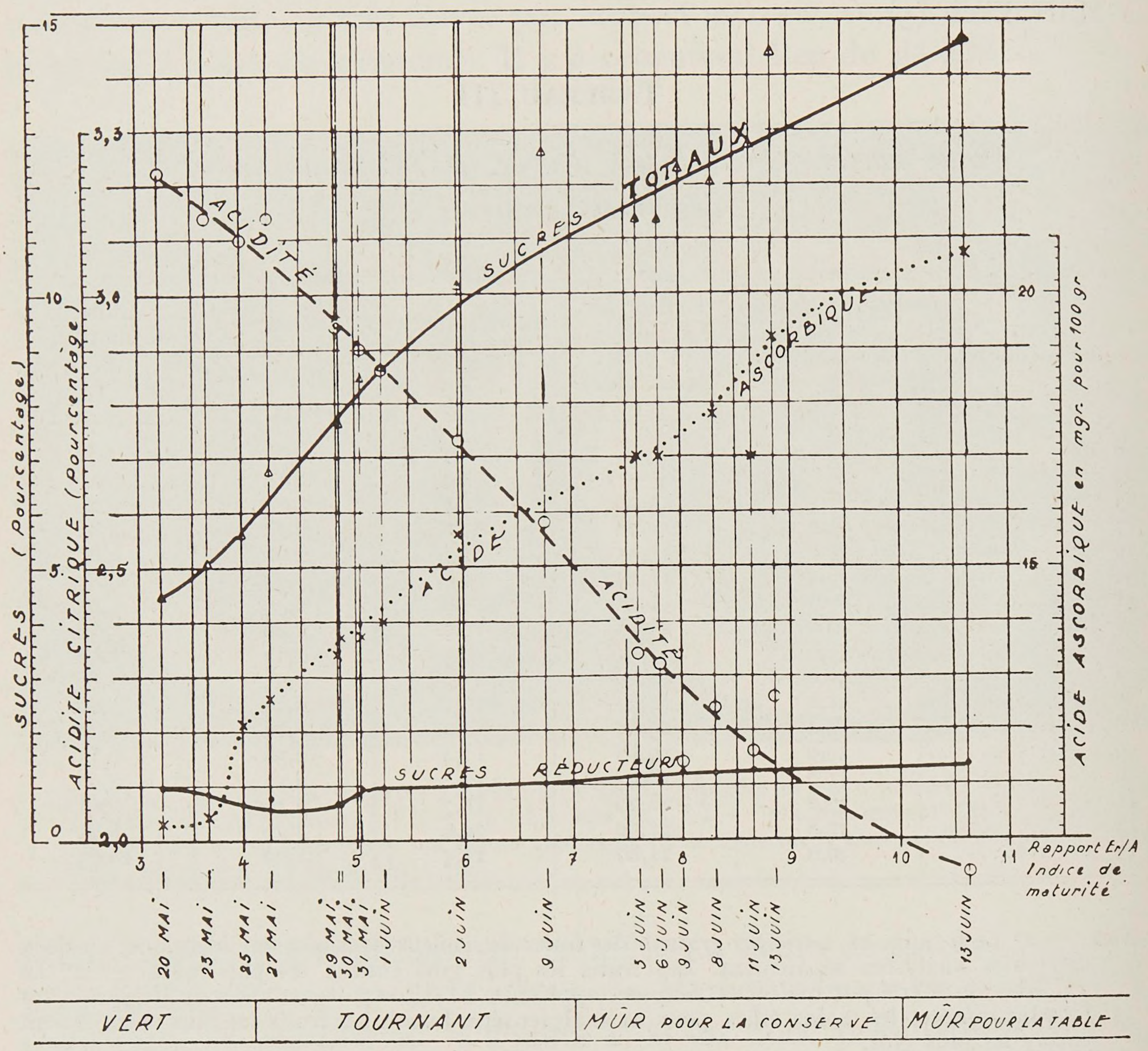


FIG. 3. — Évolution des sucres, de l'acidité et de l'acide ascorbique au cours de la maturation des abricots.

ment où ils atteignent la maturité de table. Les fruits utilisés en conserverie n'ont donc pas encore tout à fait atteint leur richesse maximum en constituants nutritifs. Le Tableau I avait déjà fait apparaître un gain dans la teneur en matières sèches jusqu'à la fin des observations.

La teneur en acide ascorbique atteint, comme l'acidité, des valeurs nettement plus élevées dans le cas étudié que dans les Canino de Marrakech (5).

5° Autres constituants et pH

L'étude des *matières pectiques* des abricots semblait devoir fournir des indications intéressantes. Malheureusement, la méthode employée ne distinguait pas entre « protopectines », « pectines vraies » et « pectines dégradées », et les possibilités matérielles de travail ne permettaient pas la détermination séparée de ces trois catégories. Les résultats contenus dans le Tableau IV expriment donc la teneur globale en « matières pectiques » mais ne peuvent conduire à aucune conclusion pratique.

TABLEAU IV

Teneur en matières pectiques et pH des abricots.
Résultats des essais d'appertisation des abricots
en fonction de l'état de maturité et du mode de traitement

Date	Matières pectiques p. cent	ph	Date	Matières pectiques p. cent	ph
23-V	0,71	3,45	2-VI	0,90	3,40
25-V	1,14	3,25	3-VI	0,80	3,50
27-V	0,96	3,35	6-VI	0,96	3,35
29-V	0,93	3,37	8-VI	0,92	3 25
30-V	0,84	3,40	9-VI	0,63	—
31-V	0,83	3,45	11-VI	0,72	—
1-VI.....	0,90	3,43	13-VI	0,79	—

La teneur en *cendres*, déterminée sur les 9 échantillons prélevés entre le 2 et le 13 juin a fourni une moyenne de 0,60 g pour 100 g de matière fraîche, tandis que la teneur en *calcium* s'élevait à 34,6 mg pour 100 g de matière fraîche, à la même époque.

Le pH n'a pas varié de façon importante au cours de la maturation, au moins pendant la durée des observations (Tableau IV). Ce résultat confirme celui de BOHART (2). Rappelons que cet auteur a mesuré, respectivement, des pH de 3,51 et 3,59 pour des fruits « verts » et « mûrs » dont les indices de maturité $\left(\frac{\text{Brix}}{\text{Acidité citrique}}\right)$ étaient 6,75 et 10,5.

II. — ESSAIS PRATIQUES DE FABRICATION DE CONSERVES APPERTISÉES

Lorsque l'état de maturité des abricots fut jugé suffisant pour que des essais pratiques de mise en conserves puissent avoir lieu, des prélèvements suffisants furent effectués dans ce but sur les mêmes arbres.

La principale difficulté résidait dans le choix du mode de traitement. En effet, ou bien on choisissait une formule standard de préchauffage

et de stérilisation, tout au long des essais, afin d'obtenir des résultats comparatifs, mais cette formule risquait d'être mal adaptée aux fruits plus ou moins mûrs, ou bien on adaptait à chaque cas un traitement approprié, déterminé par des essais préalables, et les résultats ne pouvaient plus être comparés d'une manière satisfaisante. Après quelques tatonnements nous avons finalement adopté une formule moyenne comprenant un nombre limité de traitements types (1). Avant d'entrer dans le détail il ne sera pas inutile de dire quelques mots du matériel et des méthodes utilisés.

A. — MÉTHODES ET MATÉRIEL

1° Fruits

Les fruits étaient lavés rapidement à leur arrivée au Laboratoire et oreillonnés à la main, de la même façon que dans l'Industrie. Eventuellement ils avaient été triés par grosseur au préalable.

2° Emboitage

Les oreillons étaient placés dans des boîtes « demi-hautes » (71,5 mm × 115 mm) sauf ceux des 3 et 6 juin qui furent mis dans des boîtes quatre quarts ; dans ce dernier cas ils étaient rangés en couronnes.

3° Jutage

Nous nous sommes limités, dans la plupart des essais, à la fabrication d'oreillons « au naturel », c'est-à-dire simplement jutés à l'eau, sauf pour les fruits les plus mûrs qui furent préparés « au sirop ». La composition de l'eau de jutage, ainsi que sa température, ont cependant varié au cours des essais (voir plus loin le Tableau V). Des essais préliminaires avaient montré qu'une température supérieure risquait d'être préjudiciable aux fruits.

4° Préchauffage

Divers essais d'appertisation sans préchauffage ayant donné des résultats décevants (voir plus loin), cette technique a été complètement abandonnée dès le 9 juin. Il semble que le préchauffage soit indispensable à l'obtention de produits de qualité et constitue le seul procédé rationnel de fabrication.

On sait que le préchauffage a pour objet d'éliminer l'air occlus entre les fruits ou dissous dans les tissus, et de dilater le contenu des récipients avant fermeture. Il en résulte une pression moins élevée à

(1) Dans la littérature technique, on ne trouve que des renseignements très sommaires sur les méthodes utilisables pour la mise en conserve des abricots, et ceci se comprend d'ailleurs en raison des variations très grandes auxquelles ce fruit est sujet, selon les variétés et les climats.

l'intérieur des boîtes au cours de la stérilisation et une meilleure conservation du produit au cours du stockage.

Le préchauffeur était constitué d'un bain-marie muni d'un niveau constant et dont la température pouvait être réglée au moyen d'un thermostat. A l'intérieur de ce bain-marie tournait un plateau circulaire horizontal à vitesse réglable supportant les boîtes. La vitesse de ce plateau était réglée de façon à permettre aux boîtes de demeurer un temps bien défini dans le bain-marie, après un tour de rotation (huit minutes 1/2 ou dix minutes selon les cas). Cette durée avait été déterminée empiriquement afin de permettre à la *pulpe* des fruits contenue dans les boîtes (et non au jus qui les baignait) d'atteindre la température, généralement recommandée, de 70°C, lorsque la température du bain-marie était réglée à 85°C. Des essais préliminaires avaient montré que cette température était suffisante pour obtenir le résultat recherché au bout d'un temps raisonnablement court et sans endommager les fruits.

5° **Stérilisation**

Les boîtes sortant du préchauffeur étaient immédiatement serties et soumises à la stérilisation dans un bain-marie. Pour les deux premiers essais on avait utilisé un bain-marie bouillant (100°C) mais les résultats ont montré que cette température était excessive, les fruits s'écrasaient complètement si on les laissait un temps suffisant pour une cuisson normale (20 minutes en boîtes 4/4) ; d'autres essais utilisant 14 et 10 minutes ne donnaient pas de résultats beaucoup plus satisfaisants. Ce n'est qu'à partir de 8 minutes que les fruits sortaient à peu près entiers, mais l'intérieur de la pulpe restait à moitié cru et il brunissait après ouverture des boîtes et exposition à l'air, ce qui indique nettement un degré de cuisson insuffisant pour détruire les oxydases, bien que le produit fût bactériologiquement stable. La température maximum atteinte par la pulpe était voisine de 75°C.

Par la suite, avec les boîtes préchauffées, on s'arrangea pour réaliser, à la fin de la stérilisation, une température de 80° ou 85°C dans la pulpe, et les fruits, dont le degré de cuisson était satisfaisant, ne brunissaient plus à l'ouverture des boîtes. On parvint à ce résultat en stérilisant pendant 6 minutes dans un bain à 92°C ou dans un bain à 86°C pour que la pulpe atteigne respectivement une température de 85° ou de 80°C.

Toutefois pour les fruits au sirop, le bain de la stérilisation était réglé à 93°C au lieu de 86°C pour que la pulpe atteigne 80°C au bout de 6 minutes, toujours en boîtes 1/2.

6° **Refroidissement**

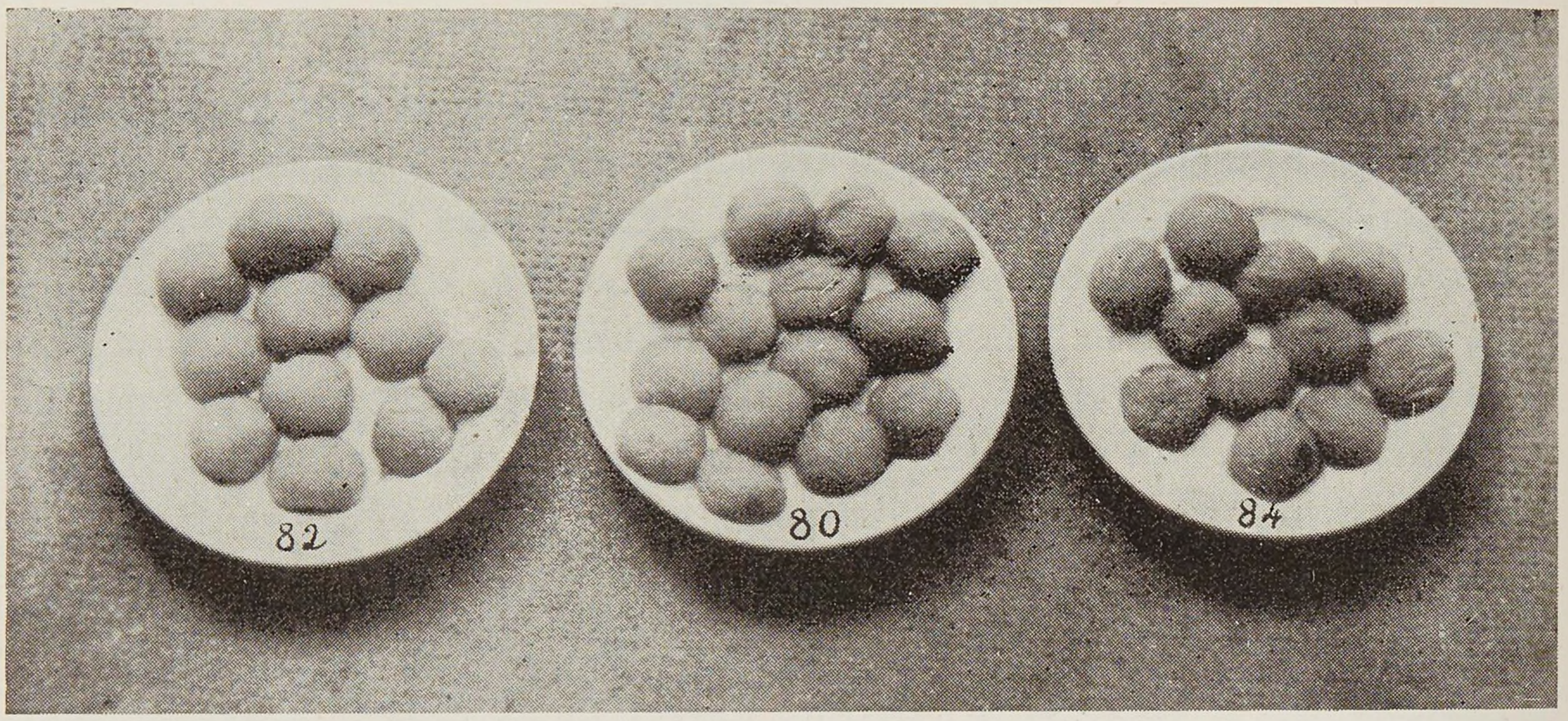
Les boîtes sortant du bain de stérilisation étaient immédiatement refroidies dans l'eau courante jusqu'à une température voisine de la température ambiante.

B. — RÉSULTATS

On trouvera dans le Tableau V les résultats des essais d'appertisation en regard des caractères physiques (couleur et dureté des fruits) et du traitement subi. Il est possible de formuler les commentaires suivants :

1° **Fruits très peu mûrs (ou tournants)** (Cliché n° 2)

Les fruits traités le 3 juin présentaient un ensemble de caractères, indiqués dans le Tableau V. En se référant à la Figure 2 on constate qu'ils se plaçaient vers le milieu de la zone des fruits « tournants » (1).



CLICHÉ n° 3. — Aspect des conserves d'abricot au naturel, préparées avec les fruits du 9 juin (cf. Tableau V), — *Légende:* 80 : juté à l'eau de ville. — 82 : juté à l'eau distillée contenant 200 mg de calcium par litre. sous forme de chlorure de calcium. — 84 : juté à l'eau distillée.

On peut cependant admettre que des fruits qui auraient présenté les caractères suivants :

— indice de maturité inférieur à 6,0,
— dureté supérieure à 7 kg/cm^2,
— rapport R/J inférieur à 1,2

se seraient comportés de la même façon, toutes choses égales par ailleurs. Cette phase de maturité est généralement considérée comme favorable à la mise en conserves.

(1) Le lot mis en conserve le 3 juin était différent du lot analysé le même jour et qui a servi à construire les figures 2 et 3. A cette époque où les fruits évoluaient rapidement, il était en effet possible de cueillir des abricots de maturité très variable.

Ces fruits furent donc stérilisés à 100°C pendant 8 minutes en boîtes 4/4 sans avoir subi de préchauffage. En dépit de cette cuisson insuffisante leur tenue fut mauvaise. Ce résultat montre bien que la méthode de traitement est d'une importance primordiale et que, même avec des fruits très fermes au départ, il y a lieu de prendre certaines précautions. Il est vraisemblable que si la technique de préchauffage utilisée ensuite avait été adoptée à ce moment, la tenue eût été bien supérieure.

2° **Fruits peu mûrs (6 et 9 juin)** (Clichés nos 2 et 3)

Ces fruits présentaient les caractères suivants :
— indice de maturité compris entre 6,0 et 8,0,
— dureté comprise entre 2,5 et 7 kg/cm^2,
— rapport R/J compris entre 1,2 et 1,6.

Cet état de maturité se place vers le début de la zone des fruits « mûrs pour la conserve » définie dans les Figures 2 et 3. Les résultats montrent que, pour des fruits identiques, le traitement avec préchauffage s'est avéré beaucoup plus satisfaisant que sans préchauffage. On voit d'autre part que l'utilisation de l'eau distillée est défavorable à la tenue des fruits, qui ont tendance à se déliter, tandis que l'eau de ville et surtout les solutions de chlorure de calcium leur conservent une certaine fermeté. Cela démontre que les matières minérales et en particulier les ions alcalino-terreux (Ca et Mg) jouent un rôle très important dans la tenue, probablement en formant, avec les matières pectiques, des pectates insolubles.

Il semble même que l'enrichissement de l'eau de ville en chlorure de calcium puisse avoir des résultats favorables, puisque la dureté des solutions utilisées était supérieure à celle de l'eau de ville et que la tenue des fruits en fut améliorée.

3° **Fruits presque mûrs** (Cliché n° 4)

Les fruits traités le 11 juin présentaient les caractéristiques indiquées dans le Tableau V, mais on peut cependant admettre que des fruits qui auraient possédé :
— un indice de maturité compris entre 8,0 et 9,0,
— une dureté au moins égale à 2,0 kg/cm^2,
— un rapport R/J compris entre 1,6 et 1,8
se seraient probablement comportés de la même façon.

Malgré leur état de maturité déjà « avancé », dont témoigne également leur belle couleur orangée, leur tenue au cours des traitements et de la conservation fut des plus satisfaisante, sauf lorsqu'ils avaient reçu de l'eau privée d'éléments alcalino-terreux.

Tableau V

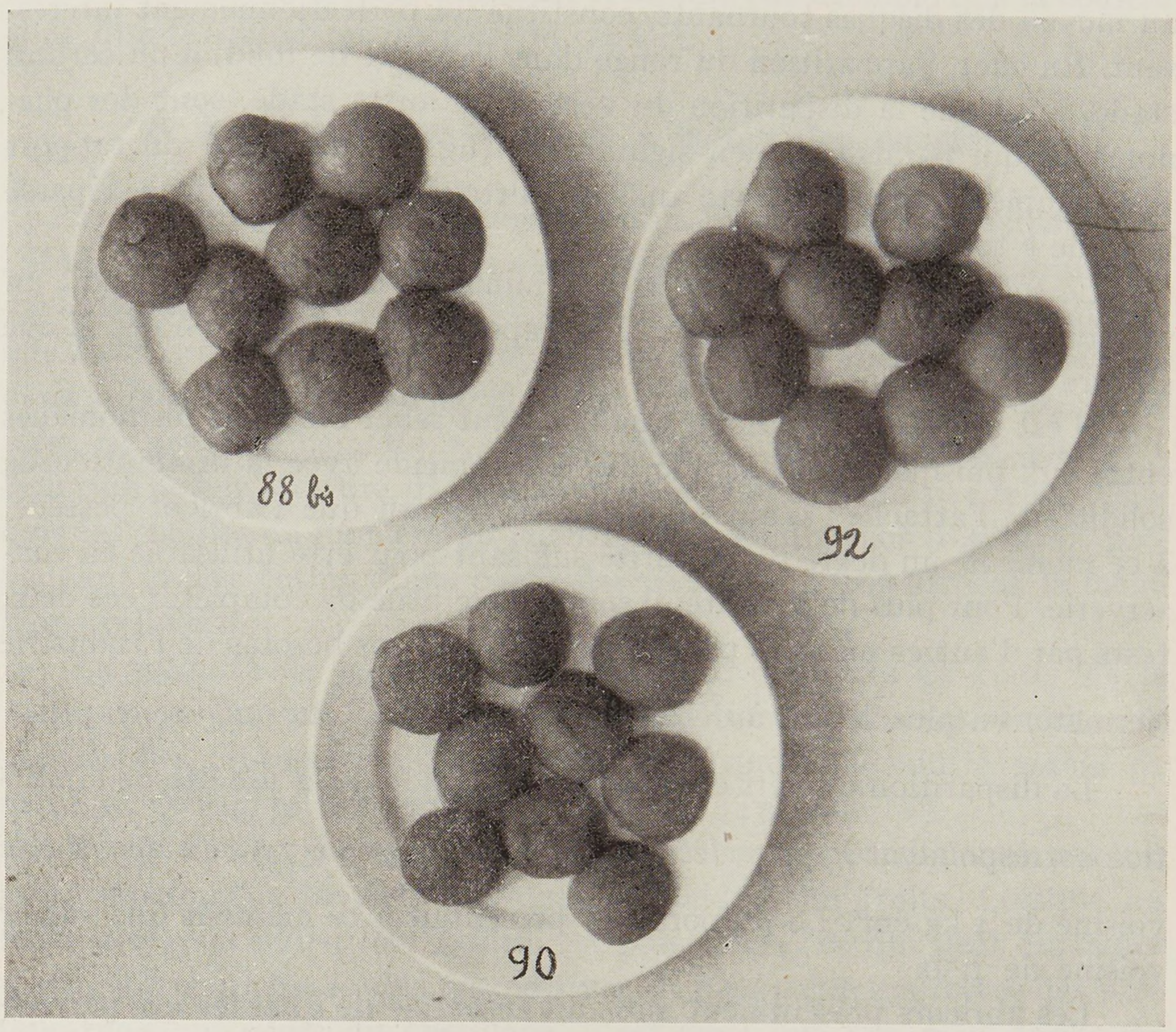
Résultats des essais d'appertisation des abricots en fonction de l'état de maturité et du mode de traitement

Date	Poids approximat. des fruits (g)	Fruits crus		Rapport Er/A	Eau de jutage		Préchauffage		Température atteinte par la pulpe	Stérilisation		Température atteinte par la pulpe °C	Résultats (après un mois de stockage au moins)	
		Rapport R/J	Dureté kg/cm²		Composition	Température °C	Température °C	Durée (min.)		Température °C	Durée (min.)		Fermeté — Tenue	Couleur
3 — 6	37	1,01	9,4	—	V	100°	sans préchauffage			100°	8	74 — 76°	très mous ; crevassés	jaune-orangé
6 — 6	37	1,37	5,9	7,0	V	100°	sans préchauffage			100°	8	74 — 76°	— d° — souvent écrasés	jaune-orangé
9 — 6	50	1,49	2,9	8,0	V	90°	85°	8,5	70°	92°	6	85°	entiers ; assez mous	d°
9 — 6	37	1,35	5,4	7,0	V	d°	d°	d°	d°	d°	d°	d°	entiers ; assez mous	d°
9 — 6	d°	d°	d°	7,0	Dist.	d°	d°	d°	d°	d°	d°	d°	quelques-uns écrasés ; mous, peau craquelée	d°
9 — 6	d°	d°	d°	7,0	Ca	d°	d°	d°	d°	d°	d°	d°	entiers, corrects	d°
9 — 6	d°	d°	d°	7,0	Ca	d°	d°	d°	d°	86°	6	80°	— d° — , mais plus fermes	d°
11 — 6	d°	1,71	2,5	8,6	V	90°	85°	8,5	70°	86°	6	80°	entiers, assez fermes	orangée
11 — 6	d°	d°	d°	8,6	Dist.	d°	d°	d°	d°	d°	d°	d°	entiers, mous ; tous peau craquelée	d°
11 — 6	d°	d°	d°	8,6	Ca	d°	d°	d°	d°	d°	d°	d°	entiers, fermes ; bien gonflés	d°
13 — 6	37	1,86	1,6	10,6	sirop	90°	88°	10	70°	93°	6	80°	entiers, fermes ; corrects	orangée

LÉGENDE : *V* : Eau de ville : Dureté = 24° hydrotimétriques ; Teneur en calcium : 84 mg p. litre — Teneur en magnésium = 33 mg/litre. — Dist. : Eau distillée. — Ca : Solution de chlorure de calcium dans l'eau distillée, à 200 mg de Ca par litre (Cette solution correspond à une dureté de 49° hydrotimétriques). — Sirop : Sirop à 38 p. 100 de saccharose, en poids (38° Brix) dans l'eau de ville, calculé pour faire 25° Brix après équilibre.

4° **Fruits mûrs**

Un seul essai « au sirop » fut effectué avec des fruits ayant atteint la maturité de table. Les résultats furent très satisfaisants ainsi qu'on peut en juger d'après le Tableau V.



CLICHÉ n° 4. — Aspect des conserves d'abricot au naturel, préparées avec les fruits du 11 juin. — *Légende:* 88 *bis:* juté à l'eau distillée. — 90 : juté à l'eau distillée contenant 200 mg de calcium par litre, sous forme de chlorure de calcium.. — 92 : juté à l'eau de ville.

III. — DISCUSSION

1° Critères de maturité

La présente étude avait pour objet principal le choix d'un certain nombre de critères de maturité utilisables par l'Industrie. On sait que cette utilisation constitue le principal débouché pour ce fruit, très difficile à transporter à l'état frais. Il serait par conséquent du plus haut intérêt de repérer d'une manière objective et précise les stades de maturité qui conviennent pour la mise en conserve. Pour dégrossir le problème il était donc d'abord nécessaire d'étudier l'évolution des caractères physiques (couleur de peau, dureté) et des constituants chimiques de l'abricot

(acidité, sucres, extrait sec, acide ascorbique, etc...), afin d'en déduire ceux qui pouvaient être retenus pour la détermination de l'état de maturité.

L'examen de la couleur fournit un premier moyen, utilisé depuis toujours. Il semble que l'analyse de la composition de la teinte de fond, au moyen des disques tournants, constitue un perfectionnement intéressant. En effet, l'apparition du rouge dans la teinte de fond, à un certain stade, ainsi que la disparition du vert, à un autre stade, sont des phénomènes qui paraissent bien significatifs (fig. 2). Le calcul du rapport R/J complète utilement cette analyse, surtout lorsque le fruit a dépassé le stade « tournant ».

La solidité de l'insertion dont la diminution constitue également un phénomène très caractéristique, n'a cependant pas fait l'objet d'une mesure au dynamomètre.

Il est intéressant de noter que l'on peut relier ces deux phénomènes entre eux puisque la disparition du vert coïncide avec la diminution de solidité de l'attache ; d'autre part il est apparu que l'abricot possède, à ce moment, un degré de maturité suffisant pour être utilisable en conserverie. Pour plus de sécurité, il serait donc utile de compléter ces deux tests par d'autres mesures plus en rapport avec les besoins de l'Industrie (fermeté) ou plus faciles à déterminer $\left(\text{rapport } \frac{Er}{A}\right)$.

La disparition du vert et la forte diminution de la solidité de l'insertion correspondent à une valeur de l'indice $\frac{Er}{A}$ égale à 7,5 et à une dureté voisine de 4 kg/cm². Le rapport R/J présentait à ce moment une valeur voisine de 1,50.

Les abricots présentaient alors un ensemble de qualités qui permettaient d'obtenir des conserves satisfaisantes. A partir de ce moment on pouvait traiter les fruits pour la fabrication des oreillons au naturel jusqu'à ce que leurs caractéristiques soient approximativement les suivantes :

— rapport $\frac{Er}{A}$ voisin de 9,5,

— dureté voisine de 2 kg/cm²,

— rapport R/J voisin de 1,80.

Il va de soi que ces résultats ne sont valables que dans le cas étudié, c'est-à-dire pour la variété Canino placée dans les conditions bien précises de terroir et de climat décrites au début de cet article.

Il faut donc se garder de toute généralisation. Ce n'est qu'en répétant ces essais pendant plusieurs années que l'on pourra se faire une idée de l'amplitude de variation des caractères étudiés. Il sera peut-être alors possible de juger ceux de ces caractères qui doivent être éliminés, en

raison d'une trop large variation, et ceux qui peuvent être retenus pour définir les états de maturité.

D'autres essais pourront indiquer les critères qui possèdent une importance primordiale pour la mise en conserve et qui peuvent, de ce fait, constituer un facteur limitatif. Il semble par exemple que la couleur et la dureté soient au nombre de ceux-ci.

2° Application des résultats à la mise en conserves

Il ne faut pas oublier que ces essais avaient pour principal objet l'étude de la conservation des abricots et notamment de la fabrication des oreillons « au naturel » dont la préparation est réputée plus délicate que celle des abricots « au sirop ». Les difficultés relatives rencontrées dans la fabrication des oreillons au naturel proviennent de la forte différence de pression osmotique entre le fruit et l'eau de jutage, jointes à l'effet de la température. Il en résulte un gonflement qui risque de disloquer les cellules au moment où la chaleur les rendra plus fragiles en provoquant la dissolution d'une partie des pectines qui constituent la membrane cellulaire.

La fragilité de la membrane augmente d'ailleurs au cours de la maturation, puisque la proportion de pectines solubles s'accroît aux dépens des protopectines insolubles, bien que la quantité totale de matières pectiques ne semble guère varier (Tableau IV).

Toutefois, ce phénomène est probablement contrebalancé par un autre phénomène inverse, qui tient à l'acidité des fruits. Lorsque les fruits sont peu mûrs, leur acidité est plus élevée, ce qui peut entraîner une dissolution plus rapide des pectines, et même une hydrolyse des protopectines, au cours du chauffage. C'est ainsi que l'on peut expliquer que des fruits, cependant encore très fermes, n'aient pas résisté à un traitement un peu brutal. Il est des cas où les abricots au naturel supportent une stérilisation de 20 minutes à 100°C en boîtes 1/1 (13), mais cela semble être l'exception puisque nous n'avons pu l'obtenir qu'une seule fois au cours de trois années, sur des fruits récoltés à Marrakech.

3° Utilisations de l'abricot en fonction du degré de maturité

La plupart des conserveurs admettent que l'on peut préparer des abricots au sirop avec des fruits bien colorés, mais qu'il y a lieu de réserver les fruits « peu mûrs », c'est-à-dire présentant encore des traces de vert sur une partie de leur surface, pour la fabrication des oreillons à l'eau. Les fruits bien mûrs, dont la fermeté a notablement diminué, ne sont plus utilisables que dans la fabrication de pulpes oreillonnées. De là, l'habitude de trier les fruits en trois lots à leur arrivée à l'usine :

A) *Fruits très peu mûrs*, avec traces de verts, destinés à la fabrication des *oreillons au naturel* ;

B) *Fruits bien colorés*, mais encore fermes, destinés à la fabrication des *oreillons au sirop* ;

C) *Fruits mûrs*, déjà tendres, destinés à la fabrication des *pulpes oreillonnées*. On ajoute dans ce lot les fruits trop petits ou mal formés constituant les « écarts de triage » des deux autres lots.

D'autre part les deux faces d'un même fruit présentent parfois des différences considérables de dureté et de couleur. La moitié la plus mûre est alors utilisée dans le lot B, tandis que l'autre reste dans le lot A. Les trois utilisations possibles décrites ci-dessus A, B, et C se placent toutes dans la zone de maturité dite « fruits mûrs » pour la conserve » (Figures 2 et 3) dont on a vu qu'elle est assez étalée dans l'échelle des indices de maturité. Les fruits du lot A sont cependant encore assez loin du degré de maturité dit « de table ».

L'idéal, du point de vue de la qualité, consisterait à préparer toutes les conserves d'abricots, y compris les oreillons au naturel, avec des fruits à la fois bien sucrés et bien colorés tels que ceux qui furent récoltés le 11 juin, c'est-à-dire avec des fruits possédant un état de maturité très proche de la maturité dite « de table ». Si la chose est possible, comme nous l'avons vu, il n'en va pas de même dans la pratique, en raison des contingences matérielles : faible étalement de la saison, nécessité de cueillir sans choisir et surtout crainte du « coup de chaleur » qui risque d'anéantir une récolte en quelques jours, voire en quelques heures selon son degré d'évolution. Dans le cas présent, il faut reconnaître que nous avons été servis par une évolution relativement lente des fruits par suite des circonstances climatiques favorables, et l'absence de tout phénomène « anormal » tel que sirocco ou chaleur excessive.

Une meilleure connaissance de la maturation de l'abricot reste cependant souhaitable, car elle peut rendre des services à l'Industrie, et c'est dans cet esprit que la présente étude a été conduite.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

On peut distinguer trois phases dans l'évolution de l'abricot, entre le moment où il est parvenu à sa taille normale, et le moment où il atteint la maturité « de table » :

1° Fruit « vert » (plus de 50 p. 100 de vert dans la teinte de fond) ;

2° Fruit « tournant » (le « Rouge » remplace le « Vert ») ;

3° Fruit « mûr pour la conserve » (disparition du « Vert » ; le « Rouge » continue à gagner sur le « Jaune »).

Les limites de ces trois phases sont assez bien définies par l'analyse

de la teinte de fond. A chacune d'elles correspond en outre un ensemble de caractères chimiques et physiques aisément mesurables.

L'industrie devrait tendre à n'utiliser que des fruits déjà bien colorés, ayant dépassé le stade « tournant », même pour la préparation des oreillons au naturel, moyennant quelques précautions. Ces précautions paraissent être l'utilisation du préchauffage et le contrôle des températures à tous les stades de fabrication.

L'addition de sels de calcium aux eaux insuffisamment calcaires peut également rendre des services importants en conserverie.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Pavlenko (O. N.). — Variations de la composition chimique des abricots en fonction des conditions géographiques et de la maturité. *Biokhim. Kul'tur Rastenii*, 1940, **7**, 222-4. (*Chem. Abst.*, 1941, **35**, 2926$_3$).

(2) Bohart (G. S.). — Chemical studies of raw products used for canning. *Canner*, 1936, **82**, n° 11, 113.

(3) Ulrich (R.). — Les repères du degré de maturité des fruits. *Fruits d'Outre-Mer*, 1946, **1**, 456-61. Voir aussi : *LaVie des Fruits*. Masson et Cie, Paris, 1952.

(4) Dupaigne (P.). — Un nouvel appareil de détermination de la couleur des produits de tomates. *Fruits d'Outre-Mer*, 1953, **8**, 260-65.

(5) D'Ersu (A. P.) et Swinzow (H.). — Évolution des abricots au verger et en chambres froides, et aptitude de ces fruits à la préparation de conserves appertisées, durant la campagne 1954 au Maroc. *Fruits d'Outre-Mer*, sous presse.

(6) Séguy (E.). — Code Universel des Couleurs. Paul Lechevalier édit., Paris, 1936.

(7) Wilson (P.). — The Wilson Colour Chart, 2 vol. The British Colour Council édit., Londres, 1938.

(8) Maerë (A.) et Paul (M. R.). — A Dictionary of Color, 2e édit. McGraw-Hill Book Csmpany, New-York, 1950.

(9) Cheftel (H.), Frichet (P.) et Estang (J.). — La détermination du résidu sec dans les substances alimentaires. *Annales Fals. et Fraudes*,

(9) Cheftel (H.), Frichet (P.) et Estang (J.). — La détermination du résidu sec dans les substances alimentaires. *Annales Fals. et Fraudes*, 1951, **44**, 122-37.

(10) Hinton (C. L.). — The quantitative basis of pectin jelly formation in relation to pH conditions. *Biochem. J.*, 1940, **34**, 1211.

(11) Cheftel (H.). — Utilisation industrielle des fruits ; confitures, marmelades et gelées. *Ets J.-J. Carnaud et Forges de Basse-Indre*, Bull. n° **7**, 2e édit., Paris, 1948 (p. 120-21).

(12) Association of vitamin chemists. — Methods of Vitamin Assay. *Intersci. Publish.*, New-York, 1951.

(13) Ildis (P.) et Patron (A.). — Préconservation des abricots à basse température en vue de leur utilisation en conserverie. *Fruits d'Outre-Mer*, 1954, **9**, 349-53.

SUR QUELQUES BACTERIES ISOLÉES DE VINS EN FERMENTATION MALOLACTIQUE.

PAR

Pierre BIDAN [1]

Station de Technologie Végétale, Versailles.

INTRODUCTION

D'assez nombreuses études ont été faites sur les aspects chimiques de la fermentation malolactique ; par contre, l'aspect microbiologique de la question a été laissé dans l'ombre, de nombreux auteurs se rapportant encore aux isolements de germes et aux caractérisations effectués entre 1906 et 1917 par MULLER-THURGAU d'une part et SEIFERT d'autre part. C'est dire que l'on a souvent étudié les effets en délaissant l'étude de l'agent.

D'autre part, dans les classifications modernes (BERGEY), les germes caractérisés au début du siècle n'ont pas toujours été classés dans une famille déterminée car il manquait à leur description un certain nombre de caractères. Il serait intéressant, à cause de l'importance du phénomène, de les faire rentrer dans une famille bien définie de cette classification moderne.

L'étude des différents facteurs du milieu agissant sur ces germes et des diverses substances de croissances indispensables au développement de ces germes, étudiées en cultures pures, faciliterait l'étude du phénomène global de la fermentation malolactique.

Les germes isolés par MULLER-THURGAU et SEIFERT l'ont été à partir de vins blancs suisses, c'est-à-dire de vins blancs très acides et rien ne prouve que ce sont les mêmes germes que l'on trouve dans les vins blancs des régions méridionales ou dans les vins rouges.

De nombreux auteurs ont conclu à l'impossibilité d'ensemencer les germes. Une connaissance plus complète de ces germes en culture pure et de leurs conditions de croissance permettrait peut-être de réviser cette conception.

Nous avons commencé l'étude microbiologique de la fermentation malolactique en étudiant des germes isolés de vins blancs secs essentiellement, car c'est dans ces vins que ce phénomène présente actuellement le plus d'importance.

(1) Avec la collaboration technique de Mme P. BIDAN.

En effet l'importance de la fermentation malolactique dans ces vins est de trois ordres :

— cette fermentation doit rendre les vins blancs souples en transformant l'acidité malique en acidité lactique, avec diminution de l'acidité totale ;

— si elle est faite tôt après la fermentation alcoolique, elle permet une stabilité des vins blancs commercialisés très jeunes (Muscadet, Aligoté, vin blanc de Champagne) en évitant qu'elle ne se produise dans les bouteilles ;

— une meilleure connaissance des facteurs agissant sur cette fermentation permettrait d'obtenir toute l'année des vins perlés.

I. — CHOIX DU MILIEU POUR L'ÉTUDE DES FERMENTS MALOLACTIQUES

Le milieu généralement utilisé par les différents auteurs étudiant la fermentation malolactique est à base d'eau de levure et d'acide malique.

Utilisant les connaissances acquises sur la croissance des ferments lactiques employés en laiterie ou en industrie de la conserve, nous avons essayé différentes variantes :

Milieu à base d'eau de levure + acide malique, auquel nous avons ajouté séparément ou ensemble du sulfate de Magnésium, du jus de tomates, de l'acétate de sodium, du carbonate de calcium. Les résultats de cet essai sont consignés sur le tableau I.

Notons que les essais qui sont rapportés dans le tableau I ont été faits après deux repiquages de souches de ferments malolactiques sur le milieu le plus simple, c'est-à-dire eau de levure + acide malique. Si on ne prend pas cette précaution on obtient pratiquement les mêmes résultats dans tous les essais. Au début, lorsque nous utilisions le milieu le plus simple, après un certain nombre de repiquages de nos souches, les germes ne repoussaient pas.

Nous avons essayé d'ensemencer avec des souches de ferments malolactiques centrifugées, lavées, mais cette méthode plus compliquée comportait plus de risques de contamination et nous a donné les mêmes résultats que la méthode indiquée ci-dessus. Le milieu utilisé en général est donc le suivant :

Acide malique	2 g
$SO_4Mg\ 7H_2O$	100 mg
SO_4Fe	traces
$SO_4Mn\ 4H_2O$	—
Acétate de Na	3 g
Jus de tomates	25 cc
CO_3Ca	1 g
Eau de levure à 6 p. 1 000	1 litre

Tableau I

Choix d'un milieu de culture, effectué sur la souche ML_2

	Eau de levure sels minéraux	Acide malique	SO_4Mg	Jus de tomates	Acétate de Na	CO_3Ca	Eau	Pyrogallate	Dosage d'acide lactique en g/l				Croissance (trouble)						
Concentration des solutions utilisées	12 g/l	60 g/l	1 g/l	25 cc/l	30 g/l	10 g/l	Q. S. 50 cc		24 h	48 h	4 j	7 j	24 h	48 h	72 h	4 j	5 j	6 j	7 j
I	15 cc	3 cc	—	—	—	—	12 cc	+	0,28	0,40	0,89	0,73	—	—	—	—	—	—	+
II	15	3	3 cc	—	—	—	9	+	0,31	0,28	0,57	0,60	—	—	—	—	—	—	+
III	15	3	3	3	—	—	6	+	0,36	0,31	1,7	2,12	—	—	—	+	+	+	+
IV	15	3	3	3	3	—	3	—	0,38	0,40	0,73	1,57	—	—	—	—	—	+	+
V	15	3	3	3	3	—	3	+	0,34	0,30	2,0	2,19	—	—	+	+	+	+	+
VI	15	3	3	3	3	3	0	+	0,31	0,68	2,16	2,45	—	+	+	+	+	+	+
VII	15	3	3	3	3	3	0	—	0,34	0,89	1,71	2,26	—	+	+	+	+	+	+
VIII	15	—	3	3	3	—	6	+	0,25	0,34	0,5	0,61	—	—	—	—	—	+	+
IX	15	—	3	3	3	3	3	+	0,31	0,25	0,28	0,61	—	—	—	—	—	+	+
X	—	3	3	3	3	—	18	+	0,19	0,31	1,06	1,78	—	—	—	+	+	+	+
XI	15	3	—	3	3	—	6	+	0,26	0,54	2,09	2,15	—	—	+	+	+	+	+
XII	15	3	3	—	3	—	6	+	0,34	0,28	0,84	1,18	—	—	—	—	—	+	+

L'eau de levure utilisée est préparée à partir de l'extrait de levure Difco. L'acide malique utilisé est le *dl*-malique, car nous n'avons pu nous procurer de l'acide *l*-malique seul attaqué par les germes ; le jus de tomates est préparé soit à partir de tomates fraîches, soit à partir de jus de tomates de conserve.

Un essai de culture en aérobiose ou anaérobiose a montré l'avantage de l'anaérobiose partielle (tubes sous pyrogallate) sur l'aérobiose, sauf pour la souche ML_4. La température de culture utilisée a toujours été de 30°C.

II. — ORIGINE DES SOUCHES

Les différentes souches utilisées proviennent de vins blancs secs d'origine géographique différente : la plupart proviennent de vins en fermentation malolactique, quelques-unes ont été isolées à partir de lies de vin ayant terminé leur fermentation malolactique. Les échantillons que nous avons utilisés proviennent d'Alsace (Riesling, Traminer, Sylvaner) envoyés par la Station œnologique de Colmar, de Muscadet transmis par la Station œnologique d'Angers, et de Gaillac (Cave coopérative de Labastide-de-Lévis). Les germes ont été isolés par la méthode de dilution en milieu liquide avec enrichissement préalable, en général avec centrifugation pour éliminer les levures, et repiquage sur milieu favorable.

III. — LES SOUCHES ISOLÉES

De ces différents échantillons, nous avons actuellement isolé 18 souches se classant comme suit :

12 streptocoques, souches dominant nettement dans la plupart des échantillons.

4 coques en tétrades ou paquets.

2 bacilles, souvent en chaînes.

Nous donnerons ici l'étude plus complète de quatre de ces souches :

ML_1 : bacille isolé de Muscadet, le 17-10-1955.

ML_2 : streptocoque isolé de Muscadet, le 17-10-1955.

ML_3 : streptocoque isolé de Muscadet, le 20-12-1955, provenant de lies.

ML_4 : coque provenant de vin d'Alsace, isolée en mai 1955 à partir du Pinot gris.

Les autres souches actuellement isolées peuvent se rattacher à l'un de ces quatre groupes.

IV. — CARACTÉRISATION DES SOUCHES

Les quatre souches actuellement caractérisées peuvent se classer dans les Lactobacilles hétérofermentatifs : en effet elles donnent toutes à partir des sucres de l'acide lactique, des produits volatils, de l'alcool et des gaz.

Ces germes ont été caractérisés suivant les tests décrits dans le *Manual of Methods for pure culture study of bacteria* (12) et classés suivant la classification du *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 6e édition (1).

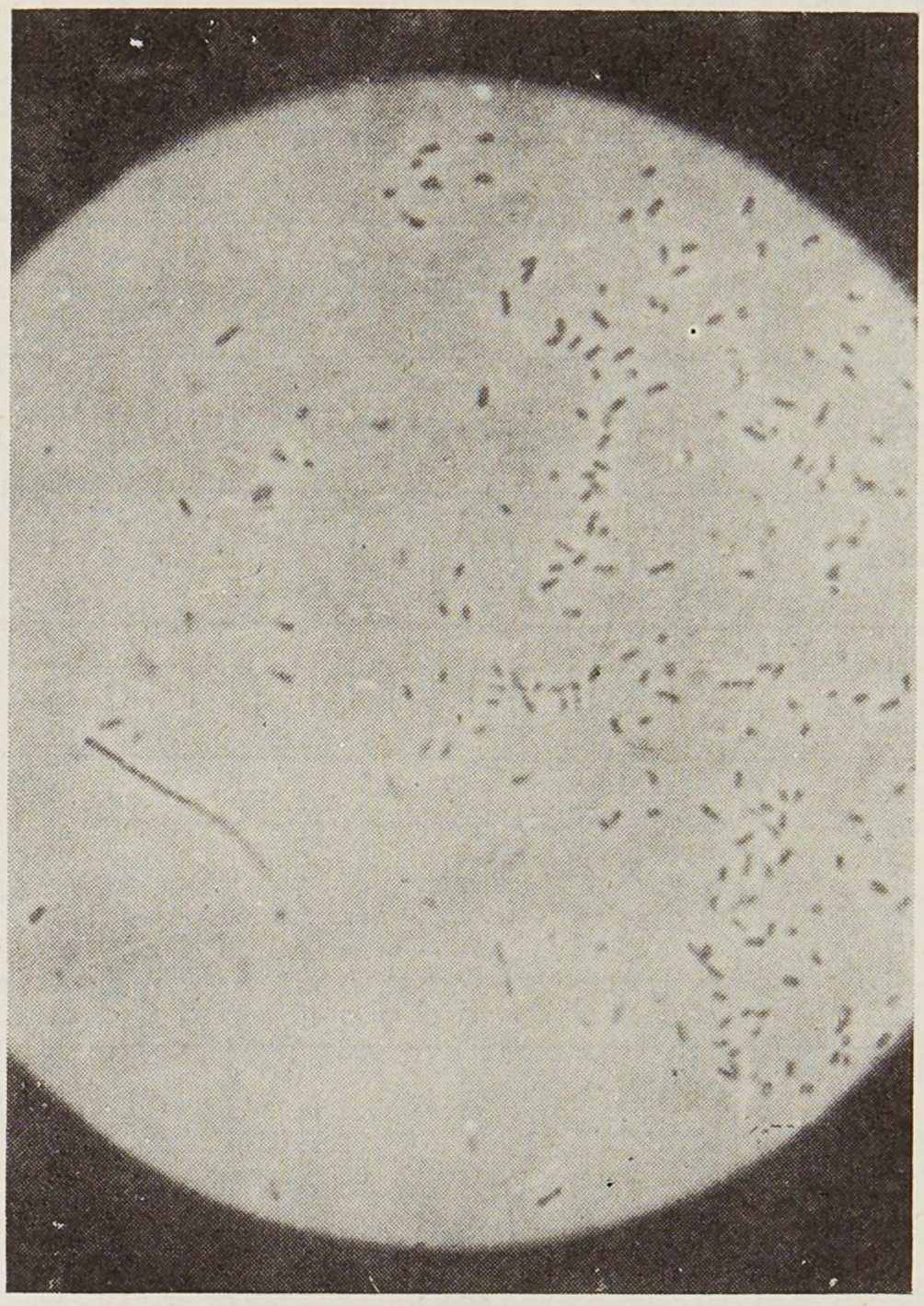


Photo 1.

Photo 1. — ML 1 (27-6-56). — *Lactobacillus Fermenti* grossissement 1275. Non Fixé).

1° Souche ML_1 : Streptobacille.

Morphologie (photo 1).

Sur vin : bacille de taille irrégulière.

Après dix jours de culture sur milieu : eau de levure-acide malique, se présente sous forme de diplobacilles de 1 μ × 2-2,5 μ, à bouts rectangulaires, quelquefois en courtes chaînes.

Ce sont des bâtonnets non mobiles, non pigmentés, ne formant pas de spores, Gram +.

Tableau II

Comparaison des souches de ferments lactiques et malolactiques : morphologie et tests.

	Références	Forme	Dimensions en μ	Spores	Pigment	Mobile	Gram	Caille le lait	Réduction du Tournesol	Liquéfaction gélatine	Catalase	Formation des nitrites	Formation AMC	Indol
Lactob. Brevis	1-14	Bâtonnets	0,7-1 × 2-4	—	—	—	+	—		—	—	—		—
Lactob. Fermenti	1	—	0,5-1 × 3-15	—	—	—	++	—	+	—	—	—		—
Lactob. Hilgardii	2-14	—	0,5-0,8 × 2-4	—	—	—	++	—	—	—	—	—		—
Bact. intermedium	7-10 II	—	0,8-0,9 × 1,2	—			+			—				
ML_1		—	1 × 2-2,5	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—
Streptococcus lactis	1	Streptocoques	0,5-1	—	—		+	+	+	—		—		—
Leucon. mesenteroides	1	Coques	0,6-1	—	—	—	+	—		—		—		—
Leucon. dextranicum	1	—	0,6-1	—	—	—	+	+	+	—		—		—
Leucon. citrovorum	1	—	0,6-1	—	—	—	+	—	+	—		—		—
Bact. gracile	4-10 II	Bâtonnets	0,5 × 0,75	—		—	+	—		—	—	—		
Bact. gracile CVRVV	15	Streptocoques	0,3-0,5	—						—				
ML_2		—	0,3-0,5	—	—	—	+	—	+	—	—	—	—	—
ML_3		—	0,2-0,5	—	—	—	+	—	+	—	—	—	—	—
Micrococcus varians	1-3	Coques	0,8-1	—	—	+—	+—	+		—		+	—	
Microc. Acidovorax	3-6 II	—	0,5-0,7	—			+			—				
Microc. Variococcus	1-3 II	—	0,8-1,5	—			+			—				
Microc. Malolacticus	1-3 II-12	—	1	—			+			—				
Pedioc. Cerevisiae	1	—	1-1,3	—	—	—	+	—		—	—	—	—	—
ML_4		—	1-1,5	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	

++ attaque forte + attaque ± attaque faible +— attaque ou n'attaque pas — pas d'attaque

Tableau III

Comparaison des souches de ferments lactiques et malolactiques : substances hydrocarbonées attaquees.

	Arabinose	Xylose	Glucose	Levulose	Saccharose	Lactose	Maltose	Raffinose	Glycérol	Acide malique	Acide tartrique	Acide critique	Acide succinique	Lactate de Calcium
L. Brevis	++	++	++	++	+	+	++	+	±	++		++		+
L. Fermenti	—	+—	+	+	+	+	+	+						
L. Hilgardii	—	++	±	++	+	±	+	±	—	++		±		
B. Intermedium	—	++	+	+		+			—	++	—	—	—	
ML_1	—	++	+	++	+	+	+	+	±	++	—	+	—	+
S. Lactis	+—	+—	+		+—	+	+	—	—					
L. Mesenteroïdes	+	+	+	+	++	+			—					
L. Dextranicum	—	—	+	+	+	+	+		—					
L. Citrovorum	—	—	+	+	—	+	—		—			+		
B. Gracile		—	++	++					—	++	—	++	—	—
B. Gracile CVRVV		—	+	++	±	—	—	—	—	+	—	++		
ML_2	++	++	++	++	+	±	±	±	±	++	—	++	—	
ML_3	—	±	+	++	—	+	±	+	±	++	—	++	—	
Micrococcus varians			+		+	+		+	+					
M. Acidovorax			+	+		+	+		—	+	—	—	—	
M. Variococcus			+	+		—	—		—		—			
M. Malolacticus			+	—					—	++	—			
P. Cerevisiae			+	+	+		+							
ML_4	—	±	++	±	+	—	—	—	±	++	—	+	—	

++ attaque forte + attaque ± attaque faible +— attaque ou n'attaque pas — pas d'attaque

Tableau IV

Comparaison des souches de ferments lactiques et malolactiques : substances formées, facteur du milieu.

	Gaz	Acide	Ac. volatil	Ac. lactique à partir de glucose	Ac. lactique à partir ac. malique	Alcool	Mannitol à partir de lévulose	Aérobie	pH	Température optimum	Tolérance à l'alcool
L. Brevis	+	+	+	+		+	+	fac.		30°	15-18°
L. Fermenti	+	+	+	+		+	+	fac.		40-42°	15-18°
L. Hilgardii	+	+	+	+	+	+	+	fac.			
B. Intermedium	+	+	+		+		+	fac.			
ML_1	+	+	+	+	+	+	+	fac.	$\geqslant$ 3,25	25-37°	20°
S. Lactis	—	+	—	+		—		fac.	$<$ 9,6	10-45°	
L. Mesenteroïdes	+	+	+	+		+	+	fac.		21-25°	
L. Dextranicum	+	+	+	+		+	+	fac.		21-25°	
L. Citrovorum	+	+	+	+		+	+	fac.		20-25°	
B. Gracile	+	+	+	+	+	+	+	fac.	$>$ 3,0	22°	
B. Gracile CVRVV		+	+					fac.	4,5-5,5	20-25°	
ML_2	+	+	+	+	+	+	+	fac.	$\geqslant$ 3,2	25-32°	20°
ML_3	+	+	+	+	+	+	+	fac.	$\geqslant$ 3,2	25-32°	17°
M. Varians								aér.		25°	
M. Acidovorax		+	+		+		—	fac.	$>$ 3,2	26,5°	
M. Variococcus							—	fac.		26,5°	
M. Malolacticus	+	+	+	+	+		—				
P. Cerevisiae		+	+	+				fac.	ac.	25°	
ML_4		+		+	+	—		fac.	$>$ 3,5	25-30°	17°

++ attaque forte + attaque ± attaque faible +— attaque ou n'attaque pas — pas d'attaque.

Physiologie.

Sur milieu eau de levure, saccharosé, gélatiné : pas de liquéfaction.

Sur milieu gélosé sous pyrogallate, en trait : croissance faible.

Sur milieu gélosé de Custers (eau de levure, glucose, CO_3Ca), incliné sous pyrogallate : colonie brillante, blanche, irrégulière, à bords ondulés.

Sur milieu liquide eau de levure, acide malique, etc. : la culture se trouble les premiers jours, puis il se produit un dépôt, le liquide surnageant devenant limpide après quelques jours.

Sur lait tournesolé : caille le lait en trente jours et réduit légèrement le tournesol en vingt jours.

Sur lait glucosé : caillage en sept jours avec synérèse.

Nitrites : pas de formation à partir des nitrates.

Aérobiose : la croissance est plus faible en aérobiose qu'en anaérobiose ; c'est un microaérophile.

Production d'acétylméthylcarbinol : négative.

Catalase : négative.

Pas de production d'indol.

Cette bactérie attaque fortement le xylose, le lévulose, l'acide malique ; attaque le glucose, le saccharose, le lactose, le maltose, le raffinose, l'acide citrique et le lactate de chaux ; attaque faiblement le glycérol ; n'attaque pas l'arabinose, l'acide tartrique et l'acide succinique.

Ce germe donne de l'acide lactique à partir du glucose et de l'acide malique (courbe n° 1).

Il donne du mannitol à partir du lévulose (le mannitol est caractérisé par la méthode de GAYON, selon JAULMES).

A partir du sucre il donne de l'alcool à la dose de 4,4 g par litre et également de l'acidité volatile.

C'est un germe producteur de gaz.

Son optimum de température est de 25 à 37° ; il ne pousse presque plus à 45°.

D'après ces caractères ce germe est très voisin de *Lactobacillus fermenti*. Il en diffère essentiellement par l'optimum de température qui est de 40 à 42° pour *Lactobacillus fermenti* et par l'attaque du xylose plus importante pour ML_1 que pour *L. fermenti*.

Ce germe est également voisin de *Lactobacillus Hilgardii*, germe cité mais non décrit par PEDERSON, dans *Bergey's Manual* (1), mais isolé et caractérisé par DOUGLAS et CRUESS en 1936 (2) et étudié comparativement avec d'autres souches de Lactobacilles hétérofermentatifs par VAUGHN, DOUGLAS et FORNACHON en 1949 (14) ; il en diffère par l'attaque du glycérol et la réduction du tournesol.

Ce germe ressemble également au *Bacterium intermedium*, germe

décrit comme responsable de la fermentation malolactique par MÜLLER-THURGAU.

Les caractères de ces germes sont donnés comparativement dans les tableaux II, III et IV.

2° Souche ML_2 : Streptocoque.

Morphologie (photo 2).

Sur vin : streptocoque, les coques étant légèrement allongées.

Sur milieu de culture eau de levure, acide malique, etc ; coques de 0,3 à 0,5 μ, toujours par paires et souvent en courtes chaînes, en milieu

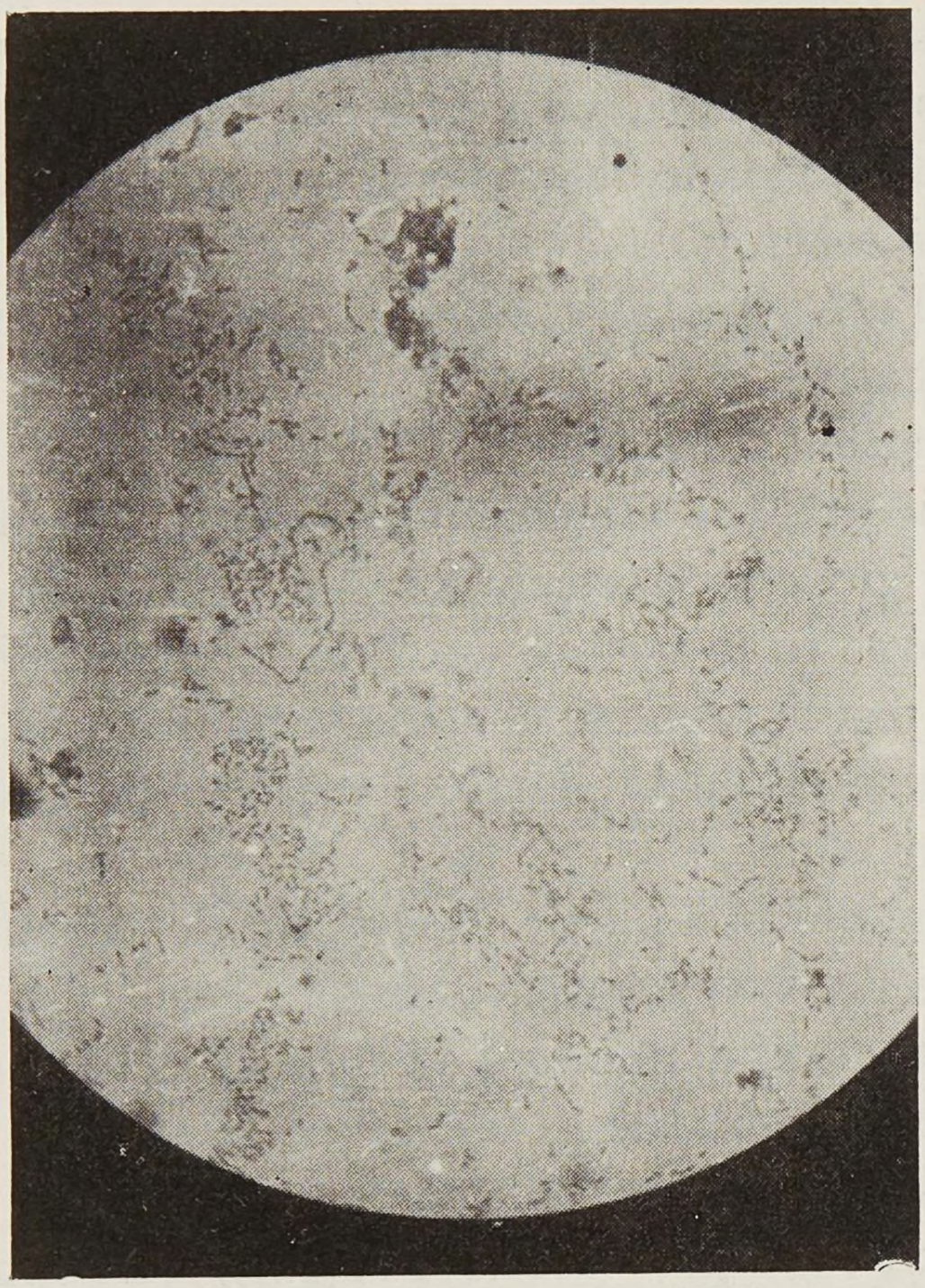


Photo 2.

Photo 2. — ML 2 (29-6-56). — *Leuconostoc* grossissement 1500. Fixé et Coloré à l'Erythrosine.

très acide (pH 3,5) les coques s'allongent parfois jusqu'à atteindre 1 μ dans une dimension.

Streptocoque non mobile, non pigmenté, ne formant pas de spores, Gram +.

Sur milieu eau de levure saccharosée, gélatinée : pas de liquéfaction.

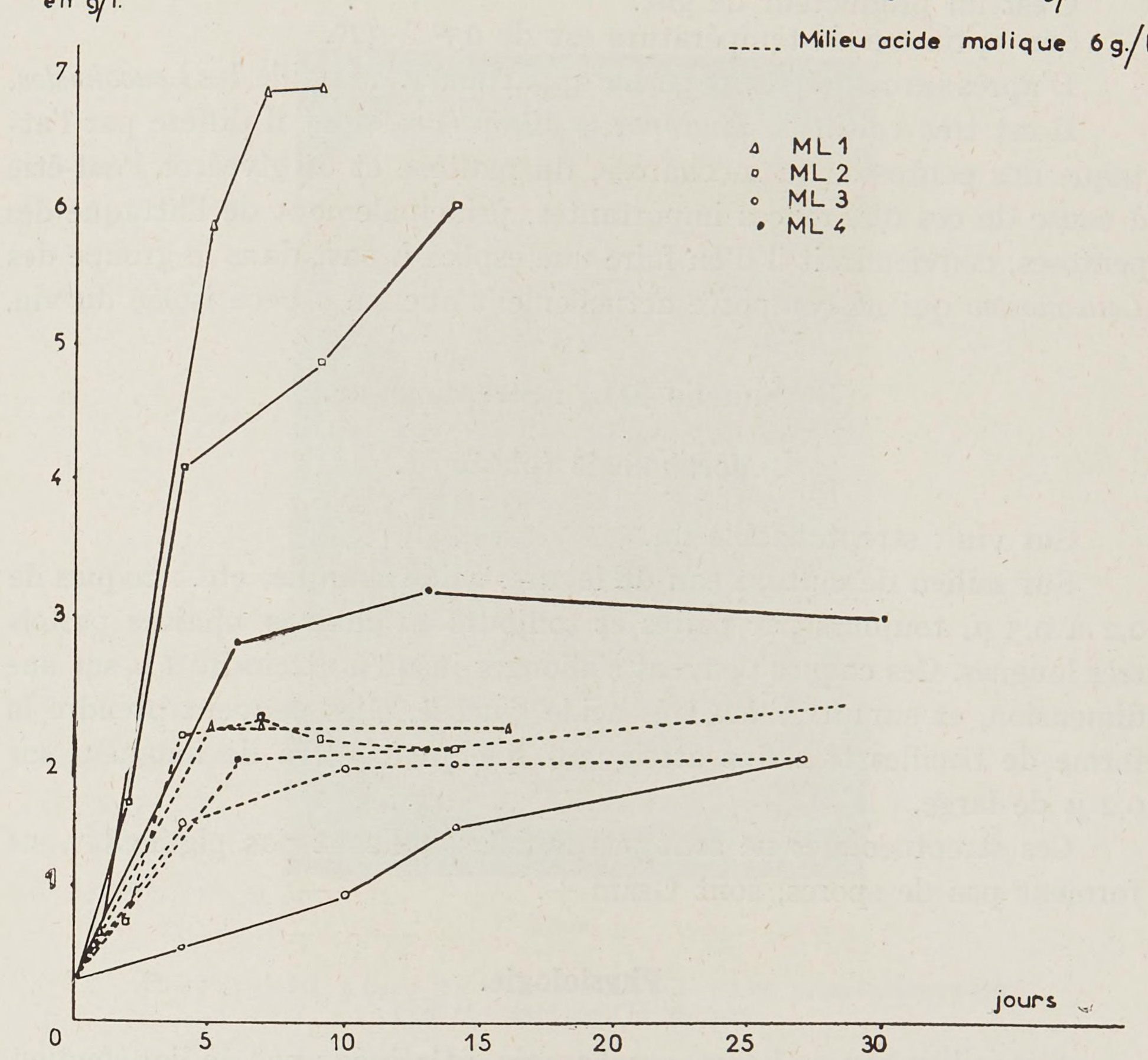
Sur milieu gélosé en trait sous pyrogallate : croissance très faible.

Sur milieu gélosé de CUSTERS, incliné, sous pyrogallate : petite colonie brillante, blanche, ronde.

Sur milieu liquide, eau de levure acide malique, la culture se trouble sur toute la hauteur du tube et ne se clarifie pas.

Sur milieu liquide eau de levure glucosée, culture se troublant et ne filant pas.

Sur lait tournesolé : tournesol réduit en quarante-huit heures sur toute la hauteur, lait non caillé.



Courbe de production d'acide lactique (dosage par oxydation permanganique) des souches ML1, ML2, ML3, ML4 à partir du glucose et de l'acide dl-malique.

Sur lait glucosé, caillage après un mois avec synérèse.

Nitrites : pas de formation à partir des nitrates.

Aérobiose : croissance plus faible en aérobiose qu'en anaérobiose : anaérobie facultatif (tableau I).

Production d'acétylméthylcarbinol : négative.

Catalase : négative.

Pas de production d'indol.

Ce streptocoque attaque fortement les pentoses (arabinose et xylose),

le glucose, le lévulose, l'acide malique et l'acide citrique ; attaque le saccharose ; attaque faiblement le lactose, le maltose, le raffinose et le glycérol ; n'attaque ni l'acide tartrique ni l'acide succinique.

Ce germe donne de l'acide lactique à partir du glucose et de l'acide malique (courbe nº 1).

Il donne du mannitol à partir du lévulose.

A partir du glucose, il donne de l'alcool à la dose de 4 g par litre et également de l'acidité volatile.

C'est un producteur de gaz.

Son optimum de température est de 25º à 32º.

D'après ses caractères, ce germe appartient à la famille des *Leuconostoc*.

Il est très voisin de *Leuconostoc citrovorum*, dont il diffère par l'attaque des pentoses, du saccharose, du maltose et du glycérol. Peut-être à cause de ces différences importantes, principalement de l'attaque des pentoses, conviendrait-il d'en faire une espèce à part dans le groupe des *Leuconostoc* qui ne comporte actuellement aucune espèce isolée du vin.

3º Souche ML_3 : Streptocoque.

Morphologie (photo 3).

Sur vin : streptobacille fin.

Sur milieu de culture eau de levure, acide malique, etc. : coques de 0,2 à 0,5 µ, toujours par paires et toujours en chaînes, chaînes parfois très longues. Ces coques peuvent s'allonger jusqu'à atteindre 1 µ sur une dimension, et sur un milieu très acide glucosé, elles peuvent prendre la forme de bacilles très fins atteignant quelquefois 2 µ de longueur sur 0,2 µ de large.

Ces streptocoques ne sont pas mobiles, ne sont pas pigmentés, ne forment pas de spores, sont Gram +.

Physiologie.

Sur milieu eau de levure saccharosée, gélatinée : pas de liquéfaction.

Sur milieu gélosé sous pyrogallate : pas de croissance.

Sur milieu gélosé de CUSTERS incliné sous pyrogallate : pas de croissance.

Sur milieu liquide eau de levure, acide malique, etc., pas de trouble mais un dépôt filant, difficile à dissocier par agitation ; le milieu devient filant dans les vieilles cultures (1 mois).

Sur milieu liquide glucosé : pas de trouble, mais le milieu devient filant en environ un mois.

Sur lait tournesolé : pas de caillage mais une légère réduction en vingt jours.

Sur lait glucosé : pas de caillage au bout d'un mois.

Nitrites : pas de formation à partir des nitrates.

Aérobiose : croissance plus faible en aérobiose qu'en anaérobiose, c'est un anaérobie facultatif.

Pas de production d'acétylméthylcarbinol.

Catalase : négative.

Pas de production d'indol.

Ce streptocoque attaque fortement le lévulose, l'acide malique et

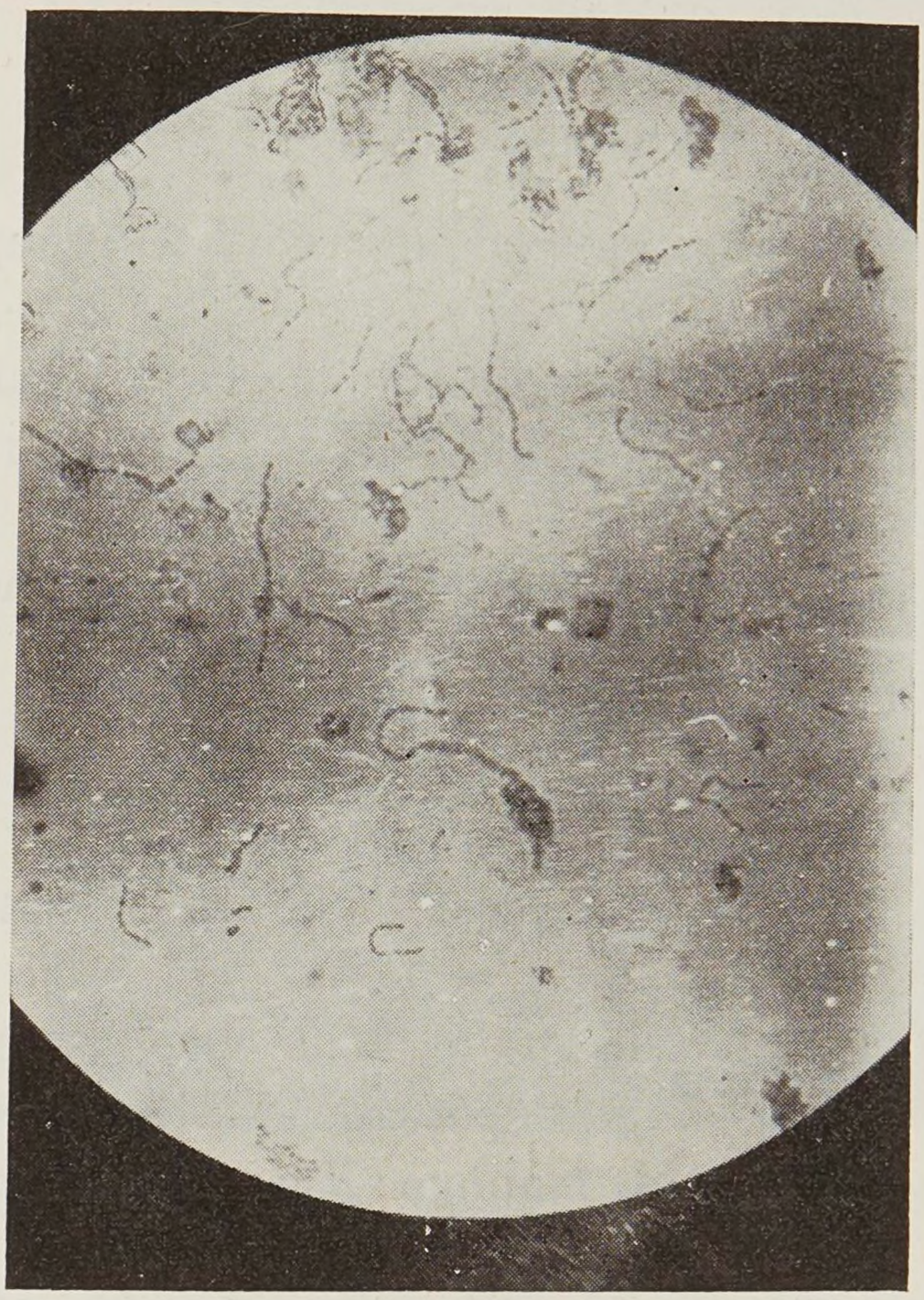


Photo 3.

Photo 3. — ML 3 (29-6-56). — *Leuconostoc* (*citrovorum*) grossissement 1275.
Fixé et Coloré par l'Erythrosine.

l'acide citrique ; attaque le glucose, le lactose et le raffinose ; attaque faiblement le xylose, le maltose et le glycérol ; n'attaque pas l'arabinose, le saccharose, l'acide tartrique et l'acide succinique.

Ce germe donne de l'acide lactique à partir du glucose et de l'acide malique (courbe nº 1).

Il donne du mannitol à partir du lévulose.

A partir du glucose, il donne de l'alcool à la dose de 1 g/l et également de l'acidité volatile.

C'est un producteur de gaz.

Son optimum de température est de 25 à 32ºC.

ML_2 est très voisin de ML_3 quoique moins actif ; il acidifie plus faiblement (courbe nº 1).

Il se rapproche plus que ML_2 de *Leuconostoc citrovorum*, bien qu'il attaque légèrement le glycérol et le xylose et qu'il ne caille pas le lait.

Ce germe est très voisin de *Bacterium gracile* tel qu'il est décrit par MÜLLER-THURGAU (4) puis SCHANDERL (11), bacille que d'ailleurs CHARLTON, NELSON et WERKMAN, puis PEDERSON (8) présentent également comme un Leuconostoc. Nous proposons de l'appeler *Leuconostoc gracile*.

4º Souche ML_4 : Coques.

Morphologie (photo 4).

Sur vin : ce sont de grosses coques toujours groupées par deux et quelquefois par quatre.

Sur milieu eau de levure acide malique, ce sont également de grosses coques de 1 à 1,5 μ, toujours groupées par paire, souvent en paquets, quelquefois en tétrades.

Ces coques sont immobiles, non pigmentées, ne forment pas de spores, Gram +.

Physiologie.

Sur milieu eau de levure saccharosé gélatiné : petites colonies, pas de liquéfaction.

Sur milieu liquide, eau de levure, acide malique, etc. : culture présentant un léger trouble et un dépôt abondant, facilement dissociable.

Sur bouillon glucosé, acide malique : léger trouble et dépôt abondant, milieu non filant.

Sur lait tournesolé : pas de caillage, pas de réduction du tournesol.

Sur lait glucosé : lait caillé en vingt jours avec synérèse.

Pas de formation de nitrites à partir des nitrates.

Aérobiose : croissance plus faible en anaérobiose qu'en aérobiose, ce germe a été cultivé sans tampon de pyrogallate de potassium.

Pas de production d'acétylméthylcarbinol.

Catalase : négative.

Pas de production d'indol.

Ces coques attaquent fortement le glucose et l'acide malique, attaquent le saccharose et l'acide citrique ; attaquent faiblement le xylose, le lévulose et le glycérol ; n'attaquent pas l'arabinose, le lactose, le maltose, le raffinose, l'acide tartrique et l'acide succinique.

Ce germe donne de l'acide lactique à partir du glucose et de l'acide malique (courbe nº 1).

A partir du glucose, il ne donne pas d'alcool.

C'est un producteur de gaz.

Sa température optimum de croissance est de 25 à 30° ; sa température mortelle est de 60°.

ML_4 est très voisin de *Pediococcus cerevisiae* dont il ne diffère que dans l'attaque du maltose, l'attaque des acides organiques par *Pediococcus cerevisiae* n'ayant pas été étudiée.

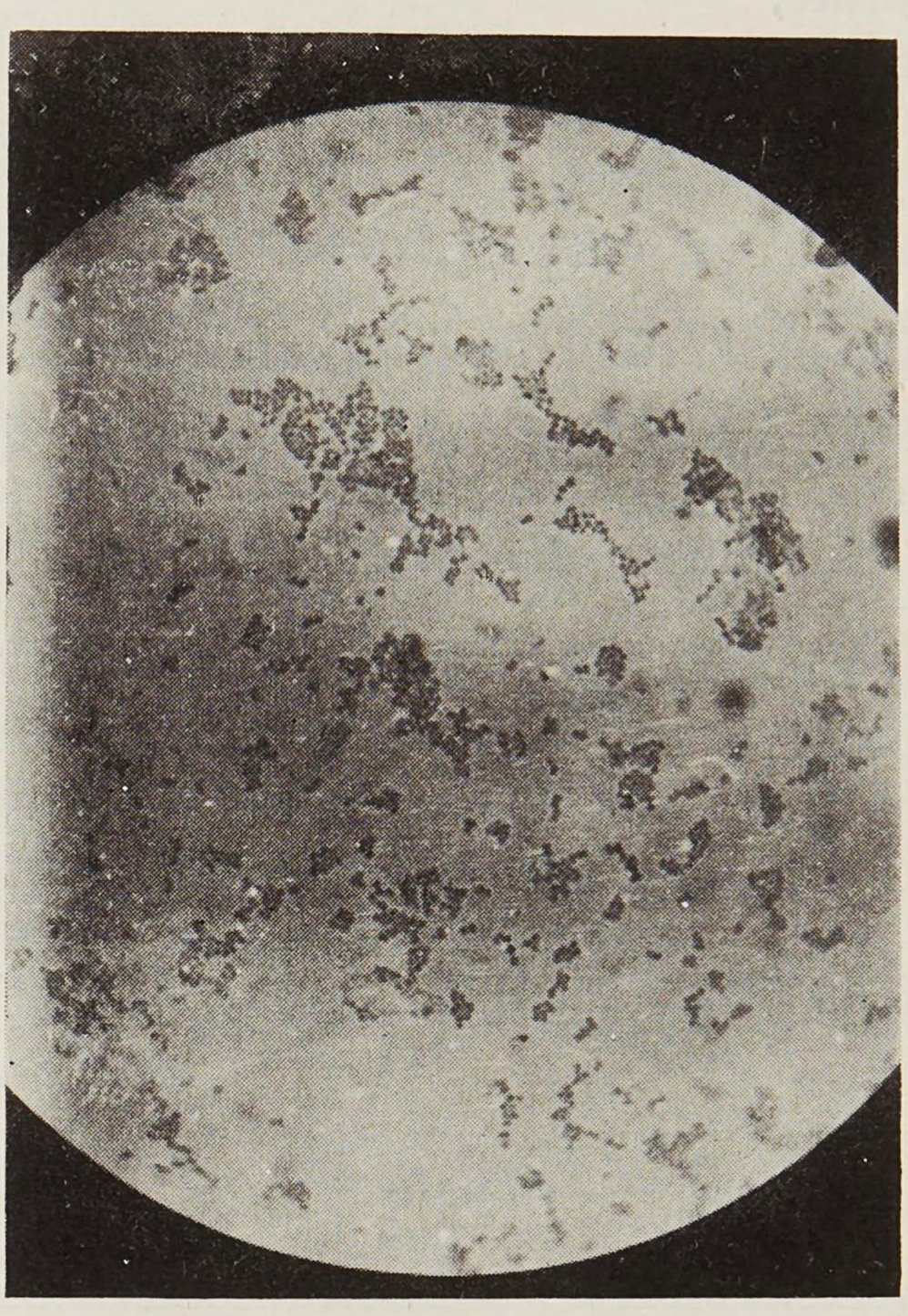


Photo 4.

Photo 4. — ML 4 (29-6-56). — *Pédiococcus* grossissement 1275.
Fixé et Coloré par l'Erythrosine.

Aucun Pediococcus isolé du vin n'ayant été décrit, l'espèce Pediococcus ne comprenant actuellement que *Pediococcus cerevisiae*, germe isolé de la bière, il conviendrait peut-être de faire un groupe à part des Pediococcus isolés du vin, germes n'attaquant pas le maltose. Nous proposons de l'appeler *Pediococcus vini*.

Ce germe est vraisemblablement le même que *Micrococcus variococcus* décrit par MULLER-THURGAU et OSTERWALDER (6) ou que *Micrococcus malolacticus* décrit par SEIFERT (12) ; il est plus voisin de ce dernier car il attaque faiblement le lévulose, il est différent de *Micrococcus acidovorax* car il n'attaque ni le lactose ni le maltose.

V. — ÉTUDE DE QUELQUES FACTEURS SUR LES GERMES

L'étude de quelques facteurs a été faite en étudiant la production d'acide lactique par oxydation permanganique (dosage d'après la méthode PEYNAUD), à partir d'un milieu contenant soit du glucose, soit de l'acide malique. Les facteurs actuellement étudiés sont :

— la température,
— l'acidité et le pH,
— la teneur en alcool.

TABLEAU V

Production d'acidité lactique exprimée en méq/l par les germes étudiés, en fonction de la température.
(Milieu avec glucose sans addition d'acide malique.)
Acidité au départ = 5,8 méq/l.

	Jours / Température			
ML_1		2	4	11
	25°	60,9	80,3	125,3
	32°	87,1	77,4	124,3
	37°	87,1	85,1	117,4
ML_2	Jours	2	4	15
	25°	17,4	60	118
	32°	51,3	88	111
	37°	49,3	82,7	87
ML_3	Jours	3	9	30
	25°	5,8	6,7	44,6
	32°	6,7	27	48,5
	37°	5,8	29	25,2
ML_4	Jours	7	13	19
	25°	58,5	79,0	70,0
	32°	8,7	62,0	62,0
	37°	11,1	6,7	6,8

1° Influence de la température.

Le tableau V nous montre la formation d'acide lactique à partir du glucose par les quatre souches ML_1, ML_2, ML_3, ML_4 aux trois températures : 25°, 32°, 37°.

ML_1 présente son optimum de température entre 25 et 37°, l'acidi-

fication démarrant légèrement plus lentement à 25°, mais atteignant le même maximum aux trois températures au bout de onze jours.

ML_2 présente son optimum de température de 25 à 32°, l'acidification étant plus lente à 25°, mais atteignant au bout de onze jours le même maximum qu'à 32°.

ML_3 est nettement retardé à 37°, acidifie plus vite à 32° mais au bout de onze jours atteint la même acidité finale à 25 et 32°.

ML_4 acidifie plus vite à 25° et presque pas à 37°.

Remarquons que tous ces germes ont un optimum de température élevé par rapport aux conditions de la pratique. Il serait nécessaire de les accoutumer aux températures plus basses, 20 et même 10°, pour pouvoir les utiliser durant de l'hiver ou au début du printemps.

2° Influence de l'acidité et du pH.

a) Influence du pH.

Le tableau VI nous montre que les pH supérieurs à 4 sont favorables à la croissance des ferments malolactiques. Un pH compris entre 3,5 et 4 retarde légèrement la croissance, mais un pH inférieur à 3,5 semble retarder considérablement le développement microbien. Cependant, ML_2 est moins sensible que les trois autres souches.

Remarquons l'influence très favorable de l'addition de CO_3Ca en présence d'acide malique.

b) Acidité.

A acidité égale, l'acide malique est moins défavorable que l'acide tartrique sur milieu glucosé.

L'acide sulfurique est nettement plus nuisible que les deux acides organiques essayés surtout sur les souches ML_3 et ML_4.

D'une façon générale, les souches ML_1 et ML_2 sont moins sensibles à l'acidité que les souches ML_3 et ML_4.

3° Influence de la teneur en alcool.

Les résultats sont consignés sur le tableau VII.

Les essais ont été faits sur un milieu complet sans glucose, ne contenant que de l'acide malique comme aliment carboné. Nous constatons que jusqu'à 5° d'alcool il n'y a aucun retard dans la croissance des quatre germes, sauf pour ML_4.

A 7° d'alcool, ML_3 et ML_4 marquent un retard de un à quatre jours sur ML_1 et ML_2.

A 10 et 12° d'alcool, ML_1 est peu ralenti, tandis que ML_2 n'a pas poussé les premiers jours.

Tableau VI

Influence de l'acidité et de différents acides sur les ferments malolactiques en présence de glucose.

Souches				ML_1					ML_2					ML_3					ML_4				
Durée en jours	Acidité théorique en méq/l	Acidité réelle en méq/l	pH	2 j	3 j	6 j	8 j	20 j	2 j	3 j	6 j	8 j	20 j	1 j	4 j	6 j	8 j	20 j	3 j	6 j	8 j	10 j	20 j
A. malique	14,9	16,5	4,25	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	—	++	++	++	++	—	++	++	++	++
	74,5	76,5	3,25	—	—	—	—	+	—	—	++	++	++	—	++	++	++	++	—	—	—	—	—
	178,9	182,0	2,85	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
A. tartrique	14,9	18,4	3,9	—	—	+	++	++	—	++	++	++	++	—	++	++	++	++	—	+	++	++	++
	74,5	84,4	2,9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	178,9	205,0	2,6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
SO_4H_2	14,9	14,5	3,7	—	—	++	++	++	—	++	++	++	++	—	—	—	+	++	—	—	—	+	++
	74,5	61,5	2,1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	178,9	145	1,8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
A. malique + CO_3Ca	14,9	2,9	6,9	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	—	++	++	++	++	—	++	++	++	++
	74,5	56,2	3,8	—	—	++	++	++	++	++	++	++	++	—	++	++	++	++	—	+	++	++	++
	178,9	161	3,2	—	—	—	—	—	—	++	++	++	++	—	—	—	+	++	—	—	—	—	—

Tableau VII

Influence de l'alcool.

(Milieu complet sans glucose.)

Souches	ML_1					ML_2					ML_3					ML_4				
Durées en jours / d° alcoolique	1	4	6	8	20	1	4	6	8	20	1	4	6	8	20	1	4	6	8	20
0°	++	++	++	++	++	+	++	++	++	++	+	++	++	++	++	+	+	++	++	++
5°	++	++	++	++	++	+	++	++	++	++	+	++	++	++	++	—	+	++	++	++
7°	+	++	++	++	++	+	++	++	++	++	—	++	++	++	++	—	+	++	++	++
10°	+	++	++	++	++	—	+	+	++	++	—	+	+	+	++	—	+	++	++	++
12°	+	++	++	++	++	—	+	+	+	+	—	+	+	+	++	—	+	+	+	++
15°	—	+	++	++	++	—	—	+	+	+	—	—	—	+	+	—	+	+	+	++
17°	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+
20°	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

A 15° d'alcool, tous les germes ont poussé. Cependant, au vingtième jour le développement de ML_2 et ML_3 était ralenti tandis que ML_1 et ML_4 avaient un développement normal.

A 17°, seuls ML_1 et ML_4 se sont développés avec un retard de quatre jours pour ML_1 et de six jours pour ML_4.

A 20°, seul ML_4 s'est développé avec un retard de quatre jours seulement.

D'autres facteurs restent encore à étudier ; nous allons entreprendre en particulier des essais sur la teneur en SO_2 (problème important pour les vins doux) et l'influence des substances de croissance, acides aminés et vitamines, ce qui permettra de savoir si la présence de levures est nécessaire, et expliquerait l'influence du débourbage et du soutirage.

CONCLUSION

Ces quelques résultats ne représentent qu'une amorce de l'étude en quelque sorte statistique, de l'aspect bactériologique de la fermentation malolactique dans les vins. Ils portent sur quelques souches isolées de vins blancs secs. D'autres isolements et caractérisations sur des souches isolées de vins rouges sont en cours.

On peut penser en toute logique qu'une adaptation des germes au milieu est probable et qu'un intérêt certain s'attache à l'établissement d'une collection de ferments malolactiques. Connaissant les milieux et les conditions de développement des souches isolées, il n'est pas trop présomptueux d'admettre qu'il sera possible de régulariser ces fermentations secondaires.

Reçu pour publication le 22 août 1956.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Breed (R. S.), Murray (E. G. D.), Hitchens (A. P.). — Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams and Wilkins Co., 6e éd. 1948.

(2) Douglas (H. C.) et Cruess (W. V.). — A Lactobacillus from California wine : *Lactobacillus hilgardii*. *Food Research*, **1,** 113-119, 1936.

(3) Hucker (G. J.). — Studies on the Coccaceae I-V. New-York State, *Agric. Exp. Sta. Techn. Bull.*, **99** (3-44), **100** (3-83), **101** (3-47), **102** (3-46), **103** (3-19), 1924.

(4) Muller-Thurgau (H.). — Bakterienblasen (Bacteriocystem). *Centr. f. Bakt.* II Abt., **20,** 396-400, 1908.

(5) Muller-Thurgau (H.) et Osterwalder (A.). — Die Bakterien im Wein und Obstwein und die dadurch verursachten Veränderungen. *Centr. f. Bakt.*, II Abt. B., **36,** 129-339, 1912.

(6) Muller-Thurgau (H.) et Osterwalder (A.). — Weitere Beiträge zur Kenntnis der Mannitbakterien im Wein. *Centr. f. Bakt.*, II Abt. B., **48,** 1-36, 1918.

(7) PEDERSON (C. S.). — The types of organisms found in spoiled tomato products. New-York. *Sta. Agr. Exp . Sta. Techn. Bull.*, **110,** 46, 1929.
(8) PEDERSON (C. S.). — The fermentation of glucose, fructose and arabinose by organisms from spoiled tomato products. New-York Sta., *Agr. Exp. Sta. Techn. Bull.*, **151,** 22, 1929.
(9) RIBEREAU-GAYON (J.) et PEYNAUD (E.). — Analyse et contrôle des vins. Béranger, 172-177, 1947.
(10) RIBEREAU-GAYON (J.). — Traité d'Œnologie. Béranger, 77-123, 1947.
(11) SCHANDERL (H.). — Die Mikrobiologie des Weines. Eugen Ulmer, Stuttgart, 113-120, 1950.
(12) SEIFERT (W.). — Ueber die Säureabnahme in Wein und den dabei stattfindenden Garungsprozess. *Ztsch. f. das landwirtsch. Versuchswesen in Oesterreich*, 567, 1903. Résumé in Centr. *J. Bakt.*, 11 Abt., **10,** 664, 1903.
(13) SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS. — Manual of Methods for pure culture. Study of Bacteria, 1954.
(14) VAUGHN (R. H.), DOUGLAS (H. L.) et FORNACHON (J. C. M.). — The taxonomy of *Lactobacillus hilgardii* and related heterofermentative lactobacillus. *Hilgardia*, **19,** 4, 133-39, 1949.
(15) MARQUES GOMES (J. V.), DA SILVA BABO (F.) et GUIMARAES (A. F.). — Estudos bacteriologicos da fermentaçao malolactica dos vinhos verdes. Comissao de Viticultura da Regiao dos Vinhos Verdes, 1953. *Estudos, Notas e Relatorios*, **4,** 17-50, 1953.

DOSAGE SIMULTANÉ DU FER ET DU CUIVRE DANS LE LAIT ET LES PRODUITS LAITIERS

PAR

R. ALIFAX et Marie BEJAMBES

Station Centrale de Microbiologie et Recherches laitières, Jouy-en-Josas.

I. — Introduction.

II. — Rappel des principales méthodes de dosage du fer et du cuivre dans les produits laitiers.

A. — Préparation des échantillons.
B. — Dosage du fer.
C. — Dosage du cuivre.

III. — Principe de la méthode de Ventura et White.

IV. — Mise au point d'une technique basée sur la méthode de Ventura et White et appliquée au lait et aux produits laitiers.

A. — Préparation des échantillons.
B. — Technique du dosage.
a) Réactifs nécessaires.
b) Établissement des courbes étalons.
c) Minéralisation :
lait, lait en poudre, crème, beurre, fromage.
d) Dosage proprement dit.

V. — Valeur de la méthode.

VI. — Applications de la méthode.

VII. — Conclusion.

I. — INTRODUCTION

Un travail en cours sur la conservation des beurres nous a amenés à étudier les techniques de dosage de petites quantités de fer et de cuivre dans les produits laitiers. On sait en effet que leur présence a une importance considérable, ces éléments jouant un rôle catalytique prépondérant dans l'oxydation des matières grasses. Dans les laits en poudre — sauf dans ceux qui sont totalement écrémés — et dans les beurres, les altérations d'origine physico-chimique sont particulièrement redoutables. Elles s'accompagnent de l'apparition de défauts d'aspect et de goût qui diminuent considérablement la valeur marchande de ces produits et qui se manifestent surtout au cours d'une conservation prolongée. Il est donc impor-

tant, avant de procéder au stockage des beurres, de vérifier si leur teneur en fer et en cuivre n'est pas telle qu'elle puisse favoriser leur altération ultérieure.

L'intérêt de cette question justifie l'abondance des travaux qu'elle a suscités. Nous n'en citerons que quelques-uns dans la suite de cet exposé.

II. — RAPPEL DES PRINCIPALES MÉTHODES DE DOSAGE DU FER ET DU CUIVRE DANS LES PRODUITS LAITIERS

A. — Préparation des échantillons

Le dosage du fer et du cuivre dans les produits laitiers nécessite la libération préalable des cations des complexes protéiques dans lesquels ils sont engagés et l'élimination des matières protéiques.

Cette question sera évoquée plus loin.

B. — Dosage du fer

Le fer peut être dosé soit à l'état ferreux soit à l'état ferrique. Dans le premier cas, la solution dans laquelle on veut le doser doit être traitée par un réducteur. On forme ensuite un complexe coloré avec certaines substances parmi lesquelles nous citerons l'o-phénanthroline (1-2), la diméthyl glyoxime (3), le 2-2′ dipyridyl (4).

Si le dosage a lieu à l'état ferrique, on fait d'abord agir un oxydant et on colore ensuite par le sulfocyanure d'ammonium (2-5-6), l'alloxanthine (7) ou la 8-hydroxyquinoléine (8).

C. — Dosage du cuivre

Le cuivre est dosé après coloration par l'éthylxanthate de potassium (5-9), la dithizone (10) et, plus couramment, par le diéthyldithiocarbamate de sodium (2, 5, 6, 11, 12).

Dans les méthodes généralement proposées, les dosages du fer et du cuivre se font sur des échantillons séparés. Il nous a semblé intéressant d'étudier l'application au cas du lait et des produits laitiers de la méthode de VENTURA et WHITE (13), mise au point pour le sérum sanguin, et qui permet d'effectuer les deux dosages sur une même prise d'essai.

III. — PRINCIPE DE LA MÉTHODE DE VENTURA ET WHITE

Sur le sérum sanguin déprotéiné et dans lequel les ions métalliques ont été libérés par un traitement acide, le fer est dosé par formation d'un complexe avec le 2-2′ dipyridyl ou l'o-phénanthroline et le cuivre à l'état de diéthyldithiocarbamate. Le complexe dans lequel entre l'ion Cu^{++} peut être extrait par des solvants de basse polarité. Ainsi un mélange à volumes égaux d'éther éthylique et d'alcool amylique permet, en un seul traitement, d'extraire la majeure partie du cuivre sans altérer le complexe ferreux. Après séparation des phases, on mesure au moyen d'un spectrophotomètre, la densité optique de chacune des solutions colorées à la longueur d'onde de 520 mμ pour le fer et 440 mμ pour le cuivre.

La succession des opérations est la suivante :

1° Libération du fer et du cuivre des protéines du sérum. Les auteurs montrent que les meilleurs résultats sont obtenus par traitement avec de l'acide chlorhydrique 6 N.

2° Précipitation et séparation des protéines. Après précipitation par l'acide trichloracétique, les protéines sont éliminées par filtration ou centrifugation, ces deux procédés donnant des résultats sensiblement équivalents.

3° Formation des complexes colorés. Le fer peut être dosé à l'état de sulfocyanure ferrique ou de l'un des composés stables que le fer ferreux donne avec le 2-2′ dipyridyl ou l'o-phénanthroline. Dans ces deux derniers cas, le fer doit donc être amené à l'état ferreux. Le réducteur qui a donné les meilleurs résultats est constitué par une solution d'hydroquinone à 2 p. 100 dans une solution aqueuse d'acide ascorbique à 0,1 p. 100. Lorsqu'on veut doser le cuivre sur le même échantillon, il vaut mieux employer le 2-2′ dipyridyl. Le complexe coloré se forme dans une large zone de pH, de 3 à 9, mais la vitesse de formation et l'intensité de la coloration varient suivant le pH auquel on se trouve placé. La technique a été mise au point pour un pH de 4,4.

L'intensité de la coloration jaune verdâtre que prend le diéthyldithiocarbamate de cuivre varie très peu pour des valeurs de pH comprises entre 4,4 et 10. A pH 4,4 les colorations données par les composés du fer et du cuivre n'interfèrent pas entre elles.

VENTURA et WHITE ont retrouvé, pour 12 échantillons de sérum sanguin additionnés de 50 ou de 100 μg de fer et de cuivre dans 100 ml, respectivement 96,7 à 101,0 p. 100 du fer et 93,0 à 101,0 p. 100 du cuivre ajoutés.

IV. — MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE BASÉE SUR LA MÉTHODE DE VENTURA ET WHITE ET APPLIQUÉE AU LAIT ET AUX PRODUITS LAITIERS

Comme toutes les méthodes de dosage des éléments métalliques dans les produits biologiques, la méthode de VENTURA et WHITE comporte une technique de préparation de l'échantillon, adaptée au cas particulier du sérum sanguin et un dosage proprement dit du fer et du cuivre. Nous n'en avons retenu que cette seconde partie et il nous a fallu tout d'abord choisir une technique de préparation des échantillons. Nous avons eu pour objectif d'adopter une méthode s'appliquant à la fois au lait en nature, aux laits concentrés ou secs et aux produits laitiers tels que le beurre et les fromages.

A. — Préparation des échantillons

Dans les différentes méthodes de dosage du fer et du cuivre dans le lait et les produits laitiers, les auteurs ont eu recours à l'un ou l'autre des trois procédés suivants :

incinération ;

minéralisation par voie humide ;

libération des cations par traitement acide.

L'incinération a d'abord été appliquée au lait (9) puis aux produits laitiers (3-14). Selon Mc DOWELL (2), tant pour le fer que pour le cuivre, l'incinération conduit à des résultats erronés, surtout avec des produits riches en matière grasse. Elle est pratiquement impossible à appliquer aux beurres.

La minéralisation par voie humide proposée d'abord par WILLIAMS (5), reprise et modifiée par de nombreux auteurs, a fait l'objet de travaux récents par HUSSONG et HAMMER (15), Mc DOWELL (2), PERRIN, LIGHTFOOT et MOIR (6). Elle donne de bons résultats. On peut lui reprocher d'être longue et de nécessiter des quantités importantes de réactifs.

Aussi a-t-on cherché à éviter cette opération en libérant les cations des complexes protéiques dans lesquels ils sont engagés et en opérant le dosage sur la solution ainsi obtenue. Les premiers essais dans ce sens ont été faits par TOMPSETT (16). Plus récemment, den HERDER et KROL (12) ont extrait le fer, le cuivre et le manganèse du beurre par chauffage avec un mélange d'acide chlorhydrique et d'alcool. PERRIN et al. (6) extraient également les métaux par un traitement acide, séparent la matière grasse après fusion, puis éliminent par filtration les protéines précipitées par l'acide trichloracétique ou l'acide tungstique. La minéralisation par voie humide et l'extraction acide leur ont donné des résultats très voisins, sauf dans le cas du lait pour lequel ils donnent la

préférence à la première méthode. KROL et den HERDER (17) ont d'autre part constaté que l'extraction des métaux par la méthode qu'ils ont mise au point pour le beurre était incomplète dans le cas du lait en nature ou du lait sec.

Aussi dans le dessein d'adopter pour les différents produits laitiers des techniques aussi voisines que possible, avons-nous choisi la minéralisation par voie humide.

Nous opérons la destruction des matières organiques en procédant à une attaque sulfo-nitroperchlorique dans des conditions un peu différentes de celles indiquées par LACHIVER et LELOUP (18).

Dans le cas de la crème comme dans celui du beurre, la minéralisation de la matière grasse pose de sérieux problèmes. Elle est longue et difficile. Elle augmente donc les chances de contamination par quelques traces des métaux que l'on veut doser. Aussi avons-nous tout d'abord opéré un traitement à l'acide chlorhydrique exempt de fer et de cuivre. Ce traitement permet de séparer la matière grasse sans l'attaquer. On élimine la majeure partie de cette matière grasse par pipetage, puis on extrait le résidu par un solvant. Comme solvant nous avons choisi le benzène, recommandé par WILLIAMS (5), parce qu'il permet une extraction à une température telle que la matière grasse soit fluide et surtout parce qu'il ne dissout pas les chlorures de fer.

Tel n'est pas le cas pour d'autres solvants. On sait par exemple, que l'éther peut extraire le fer à l'état de chlorure ferrique. Nous avons nous-mêmes constaté qu'après une extraction à l'éther les quantités de fer et de cuivre décelées à l'analyse étaient plus faibles qu'après une extraction au benzène. C'est ainsi que dans un beurre nous avons trouvé :

	Fer µg par g de beurre	Cuivre µg par g de beurre
extraction à l'éther	1,020	0,060
extraction au benzène	1,120	0,080

B. — Technique du dosage

a) Réactifs nécessaires

Acide nitrique $d = 1{,}38$;
Acide sulfurique $d = 1{,}83$;
Acide chlorhydrique $d = 1{,}19$;
Acide chlorhydrique environ 6N ;
Acide perchlorique $d = 1{,}615$;
Ammoniaque $d = 0{,}90$;
Benzène redistillé ;

Mélange à volumes égaux d'éther éthylique et d'alcool amylique redistillés ;

Paranitrophénol en solution alcoolique à 1 p. 100 ;

Solution d'hydroquinone à 2 p. 100 dans l'acide ascorbique à 0,1 p. 100 ;

Solution tampon d'acétate de sodium-acide acétique à pH 4,4 ;

2-2′ dipyridyl en solution alcoolique à 1 p. 100 ;

Diéthyldithiocarbamate de sodium en solution à 1 p. 100 ;

Solution de sulfate ferreux ammoniacal :

Dissoudre 0,702 g de sulfate ferreux ammoniacal pur dans de l'eau bidistillée, ajouter 5 ml d'acide sulfurique, amener à 1 litre ; 1 ml de cette solution renferme 100 µg de fer.

Solution de sulfate de cuivre :

Dissoudre dans un litre d'eau bidistillée 0,118 g de sulfate de cuivre cristallisé SO_4Cu5H_2O ; 1 ml de cette solution renferme 30 µg de cuivre.

b) **Établissement des courbes étalons**

On mélange volume à volume les solutions de sulfate ferreux ammoniacal et de sulfate de cuivre puis on prépare les solutions au cinquième et au dixième de cette liqueur.

1 ml de ces nouvelles solutions contient respectivement 10 et 5 µg de fer et 3 et 1,5 µg de cuivre.

A partir de ces solutions on prépare une série de tubes gradués à 10 et 15 ml et contenant, dans 5 ml, une gamme de concentrations allant de 2,5 à 50 µg de fer et de 0,75 à 15 µg de cuivre.

On ajoute dans chaque tube une goutte de solution de paranitrophénol qui sert d'indicateur virant à pH 4,4. On amène à teinte jaune par de l'ammoniaque. On refroidit puis on amène exactement à décoloration en ajoutant goutte à goutte de l'acide chlorhydrique 6N. Le milieu est alors tamponné à pH 4,4 par addition de 1 ml de la solution acide acétique-acétate de sodium.

On ajoute 0,5 ml de solution d'hydroquinone puis, après agitation, 5 à 10 gouttes de la solution de 2-2′ dipyridyl ; on agite à nouveau. Après 5 à 10 minutes le fer donne une coloration rouge. On ajoute alors 1 ml de la solution de diéthyldithiocarbamate de sodium, agite, amène à 10 ml avec de l'eau bidistillée, puis à 15 ml au moyen d'un mélange à parties égales d'éther éthylique et d'alcool amylique, bouche, agite pendant 30 secondes environ et laisse au repos. Le cuivre passe dans la phase éthérée qui se colore en jaune tandis que le fer reste dans la partie aqueuse colorée en rouge.

On sépare les phases et on détermine la densité optique des solutions

colorées au spectrophotomètre en opérant aux longueurs d'onde prescrites. Nous avons utilisé un spectrophotomètre BECKMAN, modèle B, les solutions étant contenues dans des tubes BECKMAN de 22 mm de diamètre pour le fer et de 12 mm pour le cuivre. L'absorption de base est donnée par un témoin préparé dans les mêmes conditions, mais en remplaçant la solution des métaux par 5 ml d'eau bidistillée.

Pour le fer, nous avons déterminé les densités optiques pour des quantités comprises entre 0 et 50 µg dans la prise d'essai et pour le cuivre de 0 à 15 µg. Nous avons cherché ensuite à vérifier si aux concentrations inférieures à 2,5 µg de fer et 1,5 µg de cuivre les courbes suivaient la loi de BEER. Les résultats sont portés sur les graphiques I et II ci-contre. Ils montrent que pour le fer les dosages ne sont valables que pour des quantités supérieures à 2,5 µg alors que pour le cuivre, la précision est bonne à partir de 0,5 µg par prise d'essai.

c) **Minéralisation**

Lait. — 5 ml de lait rendu bien homogène sont introduits dans un matras de KJELDAHL de 60 ml. On ajoute 1 ml d'un mélange constitué de 3 parties d'acide nitrique pour une partie d'acide perchlorique. Le matras est ensuite placé sur une feuille d'amiante de 10 cm de côté au milieu de laquelle on a ménagé un trou. La plaque d'amiante repose elle-même sur un support en métal chromé ou en acier inoxydable. Le col du matras est engagé dans l'ampoule d'un appareil de GUILLAUMIN relié à une trompe à vide.

Le matras est chauffé doucement au moyen d'un brûleur en verre que nous avons confectionné pour cet usage et qui donne une flamme de 15 à 20 mm de hauteur à extrémité éclairante.

On chauffe jusqu'à dissolution de la matière organique et apparition de vapeurs nitreuses.

Après refroidissement on ajoute 1 à 1,5 ml d'acide sulfurique et 1 ml du mélange nitro-perchlorique, Puis on chauffe jusqu'à dégagement total des vapeurs nitreuses. On recommence les affusions du mélange nitro-perchlorique et les chauffages jusqu'à ce que la minéralisation soit complète.

On chauffe alors à plein feu pour éliminer l'acide perchlorique. L'opération est terminée lorsque cesse le dégagement de vapeurs blanches. Au même moment, l'ébullition du liquide s'arrête.

L'élimination de l'acide perchlorique doit être totale. S'il restait de petites quantités de cet acide, elles pourraient oxyder le soufre du diéthyldithiocarbamate en donnant un précipité qui troublerait le milieu, rendant impossibles les lectures au spectrophotomètre. De plus l'extraction du cuivre risquerait d'être incomplète.

La quantité de lait sur laquelle porte la minéralisation a été fixée à 5 ml pour les raisons suivantes :

1° Elle doit contenir une quantité de fer supérieure à 2 µg. Or, nos premières déterminations nous ont révélé des teneurs en fer généralement comprises entre 0,6 et 0,9 µg par ml. La prise de 5 ml convient donc. Elle convient également pour le cuivre. Nous avons en effet trouvé des quantités de cuivre de 0,2-0,4 µg par ml environ soit 1 à 2 µg par prise d'essai, ce qui, nous venons de le voir, se situe dans les limites du dosage.

2° Elle doit être telle que le liquide final soit limpide. Nous avons essayé d'opérer sur 10 ml, mais une autre difficulté s'est présentée : le volume total du liquide obtenu par minéralisation ne devant pas être augmenté, tous les éléments se trouvent deux fois plus concentrés que dans le cas précédent. Or, les alcalino-terreux sont alors en quantité telle qu'ils passent difficilement ou incomplètement en solution, et le milieu reste trouble.

Les prises d'essai des autres produits ont été déterminées en nous basant sur ces mêmes observations.

Lait en poudre. — On opère sur 0,5 g du produit et on applique exactement la même technique.

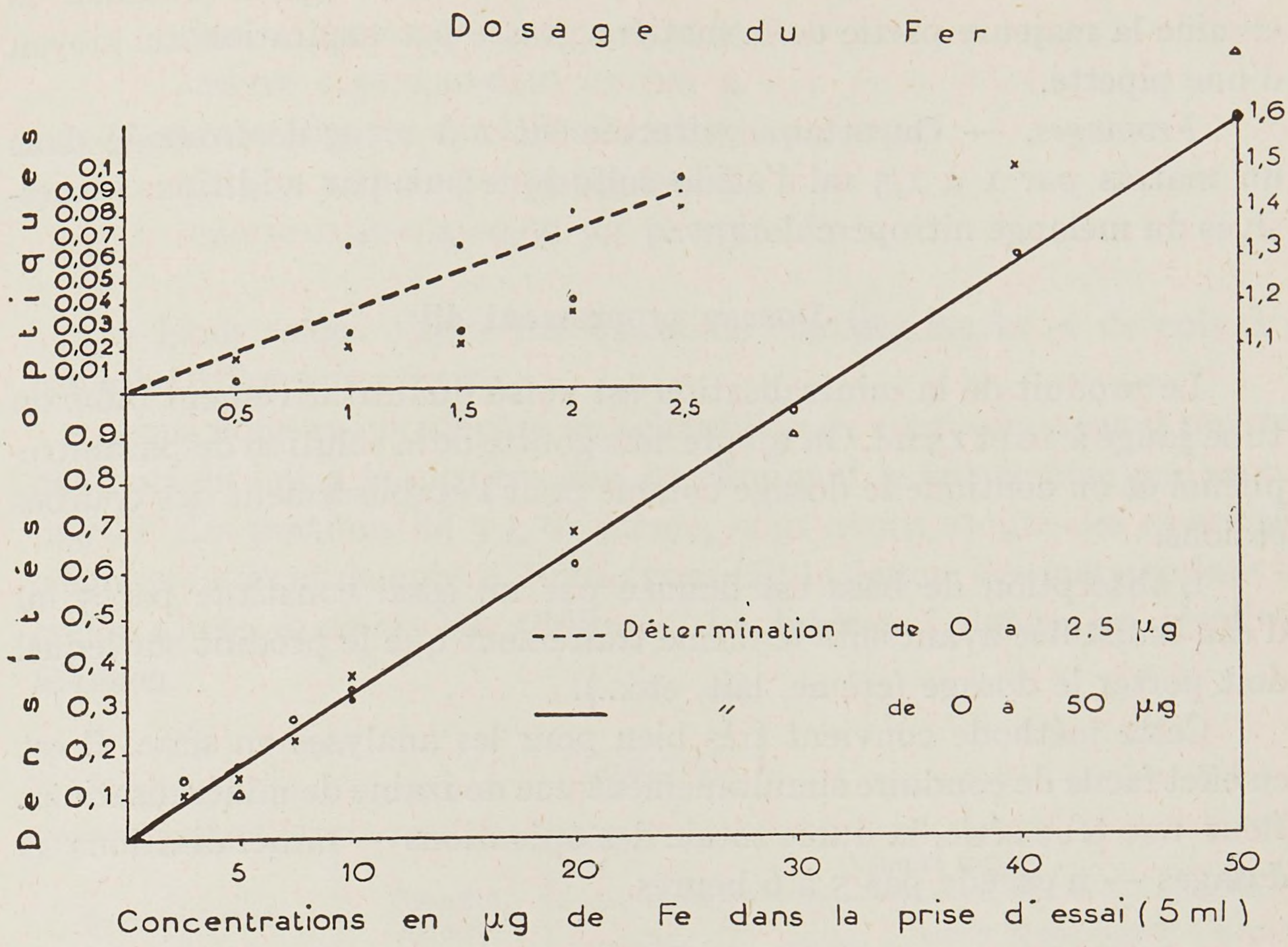
Crème. — 5 g de crème sont introduits dans un tube en verre pyrex de 22 mm de diamètre. On ajoute 5 ml d'acide chlorhydrique (d = 1,19). Le tube est plongé dans un bain-marie bouillant. On agite de temps en temps de manière à favoriser le contact de la crème et de l'acide. On prolonge l'attaque chlorhydrique pendant environ 20 minutes, puis on laisse reposer.

Lorsque la température du tube s'est abaissée à 60-70°, on verse lentement dans le tube incliné à 45°, 10 ml de benzène redistillé. La matière grasse passe en solution dans le benzène. Si la dissolution n'est pas instantanée, par de petits gestes saccadés, on imprime au tube un mouvement de rotation qui en déplaçant la couche benzénique au-dessus de la phase chlorhydrique, favorise la dissolution de la matière grasse.

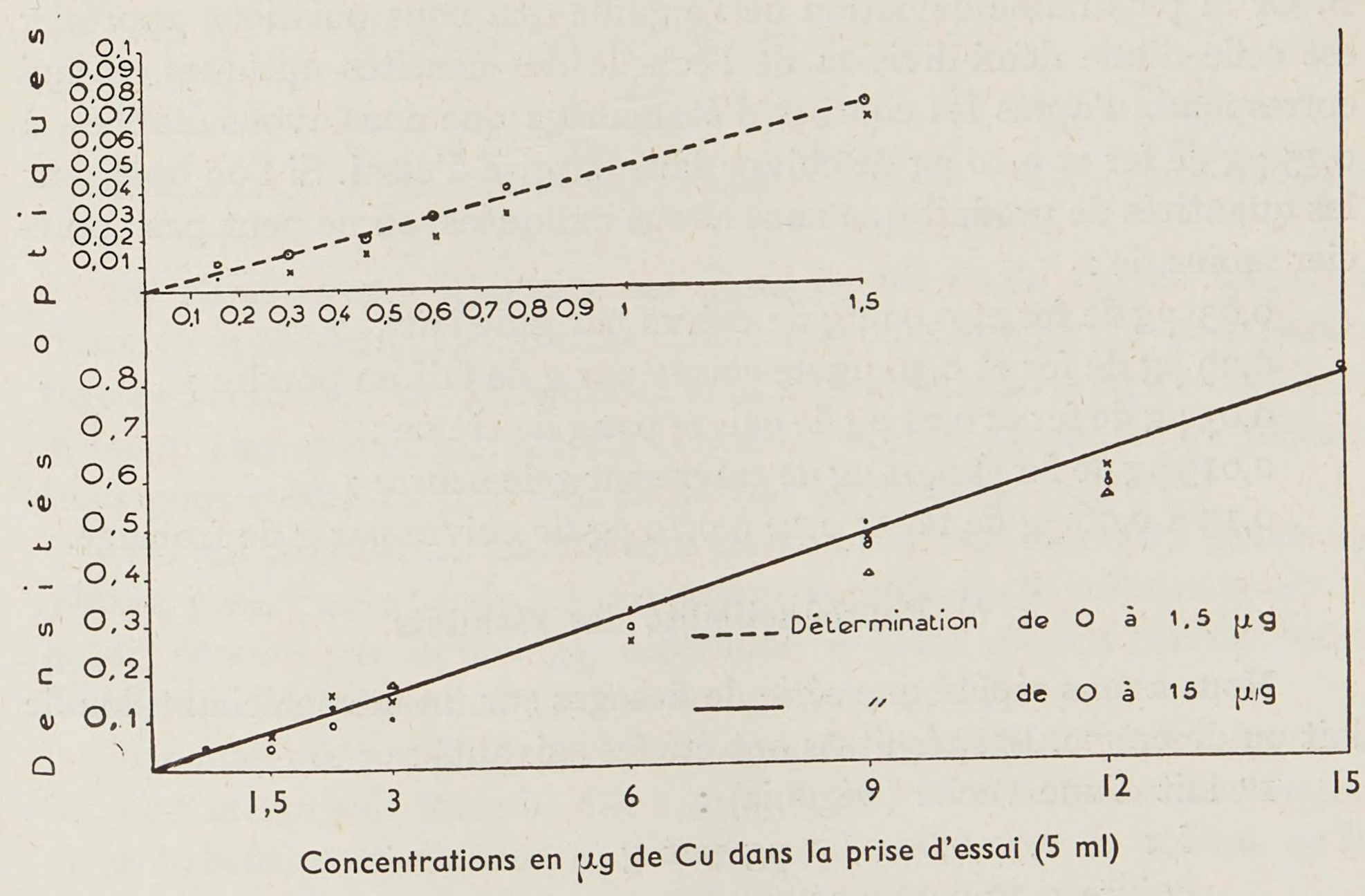
Après élimination de la couche benzénique par pipetage, on transvase la solution aqueuse dans un matras. On rince deux fois à l'eau distillée. On attelle à l'appareil de GUILLAUMIN et on chauffe. On réduit ainsi le contenu à 2-3 ml environ (consistance sirupeuse).

Après refroidissement, on ajoute 1 à 1,5 ml d'acide sulfurique. On porte à l'ébullition que l'on maintient pendant 5 minutes. On laisse refroidir et on continue la minéralisation par additions successives de 1 ml de mélange nitro-perchlorique dans les conditions indiquées pour la minéralisation du lait.

Beurre. — On attaque 10 g de beurre par 10 ml d'acide chlorhydrique (d = 1,19) en employant exactement la technique proposée pour



GRAPHIQUE I.



GRAPHIQUE II.

la crème à cette seule différence qu'avant de faire agir le benzène on élimine la majeure partie de la matière grasse par aspiration au moyen d'une pipette.

Fromages. — On attaque directement 1 à 1,5 g de fromage dans un matras par 1 à 1,5 ml d'acide sulfurique puis par additions successives du mélange nitroperchlorique.

d) Dosage proprement dit

Le produit de la minéralisation est versé quantitativement dans un tube jaugé à 10 et 15 ml. On ajoute une goutte de la solution de paranitrophénol et on continue le dosage comme pour l'établissement des courbes étalons.

L'absorption de base est donnée par un essai constitué par 5 ml d'eau bidistillée ayant subi le même traitement que le produit sur lequel doit porter le dosage (crème, lait, etc...).

Cette méthode convient très bien pour les analyses en série. Il est en effet facile de conduire simultanément une douzaine de minéralisations. Pour une telle série, la durée totale des opérations — minéralisations et dosages — n'excède pas 5 à 6 heures.

V. — VALEUR DE LA MÉTHODE

a) Sensibilité

Nous avons fait les lectures au spectrophotomètre Beckman, modèle B. Or la plus faible déviation de l'aiguille que nous puissions apprécier est celle d'une demi-division de l'échelle des densités optiques, ce qui correspond, d'après les courbes d'étalonnage que nous avons établies, à 0,15 µg de fer et 0,10 µg de cuivre dans la prise d'essai. Si l'on opère sur les quantités de produit que nous avons indiquées, on ne peut pas apprécier moins de :

0,03 µg de fer et 0,02 µg de cuivre par g de lait ;
0,29 µg de fer et 0,30 µg de cuivre par g de lait en poudre ;
0,03 µg de fer et 0,02 µg de cuivre par g de crème ;
0,015 µg de fer et 0,01 µg de cuivre par g de beurre ;
0,15 à 0,06 µg de fer et 0,10 à 0,10 µg de cuivre par g de fromage.

b) Reproductibilité des résultats

Nous avons répété une série de dosages sur un même échantillon de lait ou de crème. Les résultats ont été les suivants :

1° lait d'une vache (Bégonia) :

fer	0,70-0,60-0,60 µg par g
cuivre	0,30-0,27-0,30 µg par g

2° lait de mélange de 3 vaches :

fer 1,10-1,25-1,20 µg par g

cuivre 0,35-0,40-0,40 µg par g.

3° crème séparée du lait abandonné au repos :

fer 1,20-1,30-1,25 µg par g

cuivre 0,40-0,45-0,50 µg par g.

c) Nous avons ajouté des quantités connues de fer et de cuivre à des échantillons de crème.

Ainsi nous avons préparé un échantillon de crème en laissant reposer une nuit du lait à la glacière puis en éliminant le lait écrémé par soutirage. A des portions de 5 g de crème, nous avons ajouté des quantités connues de fer et de cuivre. Nous avons fait le dosage des métaux dans la crème avant et après ces additions. Le tableau I donne les résultats obtenus.

TABLEAU I

Quantité initiale	Quantité ajoutée	Quantité totale		
		calculée	trouvée	erreur % par rapport à la quantité calculée
		Fer		
5,25 µg	5 µg	10,25 µg	11 µg	+ 7,3
«	10 —	15,25 —	14 —	— 8,1
«	10 —	15,25 —	13 —	— 14,7
		Cuivre		
1,6 µg	1,5 µg	3,1 µg	3,25 µg	+ 4,8
«	1,5 —	3,1 —	3,50 —	+ 12,8
«	3 —	4,6 —	4,7 —	+ 2,1
«	3 —	4,6 —	5 —	+ 8,7
«	6 —	7,6 —	8,4 —	+ 10,5

d) Nous avons déterminé les doses de fer et de cuivre que l'on retrouve après écrémage dans la crème et le lait écrémé et, après barattage de la crème, dans le beurre et le babeurre, puis nous en avons dressé le bilan. Les opérations ont été conduites avec le maximum de précautions pour éviter les contaminations par les métaux.

Le lait a été trait directement dans un flacon en verre pyrex de 3 litres, pesé, puis abandonné une nuit au frigorifique. On a ensuite séparé le lait écrémé par siphonage, déterminé le poids du lait écrémé, celui de la crème, ainsi que leur teneur en fer et en cuivre.

La majeure partie de la crème, préalablement pesée, a été barattée dans un mélangeur Turmix. On a recueilli et pesé séparément le beurre et le babeurre, et déterminé les quantités de fer et de cuivre qu'ils contiennent.

Le tableau II donne les résultats obtenus. Pour la première opération, l'écrémage, les résultats sont rapportés à 1 kg de lait entier, et pour la dernière opération, le barattage, à 1 kg de crème.

TABLEAU II

Première opération : écrémage

N° de l'essai	Lait entier			Lait écrémé			Crème			Bilan (lait écrémé + crème)			
	Pds en g	Teneur totale en µg		Pds en g	Teneur totale en µg		Pds en g	Teneur totale en µg		Fe		Cu	
		Fe	Cu		Fe	Cu		Fe	Cu	Total en µg	erreur %	Total en µg	erreur %
1	1000	725	200	782	508	156	217	239	52	747	+ 3,0	208	+ 4
2	1000	749	240	842	547	202	157	189	47	736	— 1,7	249	+ 3,7
3	1000	807	199	806	604	129	193	193	69	797	— 1,2	198	0

Deuxième opération : barattage

N° de l'essai	Crème			Babeurre			Beurre			Bilan (babeurre + beurre)			
	Pds en g	Teneur totale en µg		Pds en g	Teneur totale ee µg		Pds en g	Teneur totale en µg		Fe		Cu	
		Fe	Cu		Fe	Cu		Fe	Cu	Total en µg	erreur %	Total en µg	erreur %
1	1000	1100	229	806	925	192	149	124	29	1049	— 4,6	221	— 3,4
2	1000	1197	297	817	1059	260	174	144	24	1203	+ 0,5	284	— 4,3
2	1000	1000	358	664	796	331	261	261	78	1057	+ 5,7	409	+ 14,3

VI. — APPLICATIONS DE LA MÉTHODE

Nous avons appliqué la méthode que nous venons de décrire à la détermination de la teneur en fer et en cuivre du lait et de quelques produits laitiers. Les résultats que nous donnons ci-après sont tous exprimés en µg de fer ou de cuivre par g du produit envisagé.

Dans des laits individuels recueillis dans des récipients de verre et manipulés à l'abri des contaminations par les métaux, nous avons trouvé des valeurs variant de 0,6 à 1,2 de fer et de 0,20 à 0,40 de cuivre.

Les déterminations faites par les différents auteurs ont généralement porté sur des laits qui sont restés en contact avec des surfaces métalliques, ce qui explique la divergence des résultats obtenus. Ainsi, SUPPLEE et BELLIS (9) ont trouvé pour 23 échantillons de laits individuels des teneurs en cuivre s'échelonnant de 0,2 à 0,8 avec une moyenne de 0,52 et DAVIES (14) sur 15 échantillons de lait frais 1,5 à 2,4 de fer et 0,15 à 0,65 de cuivre.

Les crèmes préparées au laboratoire à l'abri de toute contamination par les métaux ont révélé des teneurs en fer de 0,25 à

1,30 et en cuivre de 0,10 à 0,50. Les nombres donnés par Mc Dowell s'échelonnent respectivement de 1,2 à 3,7 et de 0,12 à 0,40. Williams (5) a trouvé dans des crèmes industrielles de 1,2 à 2,0 de fer et une quantité de cuivre élevée : 1,2 à 2,6.

Les variations de la teneur en métaux dans la crème au cours des manipulations ressortent de l'essai ci-dessous. Nous avons suivi la teneur en fer et en cuivre de deux lots de crème provenant d'une même laiterie industrielle depuis la sortie de l'écrémeuse jusqu'au moment du barattage. Les résultats ont été les suivants :

Tableau III

Lieu du prélèvement	Fer en µg par g	Cuivre en µg par g
	Lot 1	
Sortie de l'écrémeuse	0,60	0,30
Cuve de maturation	0,70	
Baratte	1,05	0,30
	Lot 2	
Réception de la crème	0,30	0,10
Bac de distribution	0,70	0,15
Baratte	1,75 — 2,25	0,65

On constate un enrichissement progressif en fer, la teneur en cuivre restant constante dans un cas et augmentant dans l'autre.

Dans des beurres fabriqués au laboratoire, nous avons trouvé en moyenne 0,8 de fer et de 0,14 à 0,20 de cuivre. Il convient de dire que ces beurres n'avaient pas été lavés et que la quantité de babeurre qu'ils contenaient était anormalement élevée, de l'ordre de 27 p. 100.

Nous avons effectué d'autre part des dosages de métaux sur des beurres dont l'altération avait été reconnue par un collège d'experts. Nous en donnons ci-dessous les résultats :

N° de l'échantillon	Fer µg par g	Cuivre µg par g
1	0,90	1,80
2	1,30	0,60
3	1,10	traces
4	0,40	traces
5	1,20	0,55

Davies estime qu'un beurre contient normalement 1 de fer et 0,5 de cuivre, mais trouve dans des beurres dont le goût est altéré, des quantités beaucoup plus importantes de ces métaux. Pour Mulder (20) la teneur moyenne du beurre en fer est de 0,2 et en cuivre de 0,05.

Perrin et al. ont trouvé que, sur 278 échantillons de beurres indus-

triels 23 p. 100 contenaient moins de 0,10 de cuivre, 46 p. 100 de 0,11 à 0,15, de tels beurres étant d'une qualité satisfaisante. Au-delà de ces doses le goût est douteux ou mauvais. Les quantités de fer contenues dans les beurres de bonne qualité ne dépassent pas, si l'on se reporte aux valeurs données par ces auteurs, 1,5.

D'après JULIEN et MARTIN (21) le fer contenu dans les beurres fabriqués dans 68 usines canadiennes oscille entre 0,32 et 1,65 avec une moyenne de 0,905.

Ajoutons enfin que nous avons dosé le fer et le cuivre dans quelques autres produits laitiers : lait en poudre pour lesquels nous avons trouvé 6 à 15 de fer et 2 à 8 de cuivre, fromages de Camembert pour lesquels ces mêmes déterminations ont donné respectivement 8 et 1,2.

VII. — CONCLUSION

L'adaptation que nous avons faite de la méthode de VENTURA et WHITE permet d'effectuer simultanément les dosages du fer et du cuivre dans le lait et les produits laitiers. Elle présente l'avantage d'être rapide, de mettre en œuvre des quantités très réduites de matières premières, de n'utiliser que des réactifs d'usage courant.

Dans le cadre d'études sur l'aptitude des beurres à la conservation, elle permet un triage rapide des beurres et l'élimination de ceux qui, du fait de leur teneur trop élevée en fer et en cuivre, ne sont pas aptes à supporter un stockage prolongé.

Reçu pour publication le 5 *novembre* 1955.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) BANDEMER (S. L.), CHAIBLE (P. J.). — Determination of iron. A study of the o-phenanthroline method. *Ind. Eng. Chem.*, **16,** 1944, 317.
(2) M DOWELL (A. K. R.). — The estimation of copper and iron in cream, butter and dry butterfat. *J. Dairy Res.*, **15,** 1947, 70.
(3) SCHWARZ (G.). — Dosage du fer dans le beurre. *Milchw. Forsch.*, **3,** 1926, 468.
(4) HILL (R.). — A method for the estimation of iron in biological materials. *Proc. Roy. Soc.*, **107,** 1930, 205.
(5) WILLIAMS (W.). — The determination of copper and iron in dairy products. *J. Dairy Res.*, **3,** 1932, 93.
(6) PERRIN (R.), LIGHTFOOT (F.) et MOIR (G. M.). — Copper and iron in dairy produce. Improved methods of analysis. *J. Dairy Res.*, **18,** 1951, 77.
(7) LESNE (E.), CLÉMENT (R.) et ZIZINE (P.). — Sur la teneur en fer du lait de femme et du lait de certains mammifères (ânesse, chèvre, vache). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **12,** 1930, 1410.
(8) LAVOLLAY (M. J.). — Micro et submicrodosage colorimétrique du fer. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **17,** 1935, 432.

(9) SUPPLEE (G. C.) et BELLIS (B.). — The copper content of cow's milk. *J. Dairy Sci.*, **5,** 1922, 455.
(10) FISCHER (H.) et LEOPOLDI (G.). — Nachweis und Bestimmung kleiner Zinkmengen mit Dithizon. **2** *Z., Anal. chem.*, 107, 1937, 241.
(11) CALLAN and HANDERSON. — A new reagent for the colorimetric determination of minute amounts of copper. *Analyst,* **54,** 1929, 650.
(12) den HERDER (P. C.) et KROL (B. M.). — Routine determination of copper, iron and manganese in butter. *Neth. Milk Dairy J.*, **4,** 1950, 42.
(13) VENTURA (S.) et WHITE (J. C.). — The determination of iron and copper in single serum samples. *Analyst,* **79,** 1954, 39.
(14) DAVIES (W. L.). — Observations on the copper and iron content of milk and other dairy products. *J. Dairy Res.*, **3,** 1932, 86.
(15) HUSSONG (R. V.) et HAMMER (B. W.). — Importance of copper in certain colour changes in butter. *Food Res.*, **9,** 1944, 289.
(16) TOMPSETT (S. L.). — Thiolactic acid as reagent for the determination of the inorganic iron content of certain biological materials. The copper content of the blood. Studies of the complexes of iron with various biological materials. The extraction of copper in urine and faeces and its relation to the copper content of the diet. *Biochem. J.*, **28,** 1934, 1536, 1544, 1802 et 2088.
(17) KROL (B. M.) et den HERDER (P. C.). — A routine method for the determination of copper in milk and in dried millk *Neth. Milk Dairy J.*, **9,** 1955, 56.
(18) LACHIVER (F.) et LELOUP (J.). — Techniques de laboratoire (J. Loiseleur). Masson éd., 1954, 408.
(19) GRINDLEY (D. N.), BURDEN (E. M.) et ZAKI (A. H.). — The quantitative analysis of iron stones containing small amounts of titanium, vanadium, manganese, chromium and phosphorus. *Analyst,* **79,** 1954, 95.
(20) MULDER (H.) avec la collaboration de KRUISHEER (C. I.), den HERDER (P. C.) et Van GINKEL (J. G.). — The effect of copper, iron and manganese salts on the flavour and the keeping quality of butter. *Neth. Milk Dairy J.*, **3,** 1949, 37.
(21) JULIEN (J. P.) et MARTIN (G.). — Effect of iron on the quality of Quebec butter. *Quebec Lait,* **11,** 1952, 19.

BIBLIOGRAPHIE

LES OLÉAGINEUX ET LEURS TOURTEAUX (1)

PAR

JUILLET, SUSPLUGAS, ET COURP.

Excellent ouvrage qui mériterait beaucoup plus que la courte analyse que nous devons en faire ; son titre est trop modeste. Il s'agit d'un traité qui dépasse en importance tout ce qui avait été publié précédemment en France sur ce sujet.

Écrit par des botanistes il est naturel que la partie botanique de l'ouvrage en soit la plus développée et la plus complète, mais il comporte aussi d'importants développements chimiques, technologiques et statistiques.

Nous distinguerons dans la courte présentation que nous devons en faire : la partie botanique, la partie technologique, la partie chimique et les monographies.

La détermination botanique des espèces oléagineuses est une des parties les plus complètes et les plus étudiées. L'origine des plantes cultivées, leurs synonymies, leurs diverses variétés sont indiquées en détails. L'étude micrographique des graines oléagineuses et de leurs tourteaux constitue un très important chapitre ; on n'apprécie pas toujours à leur valeur les précieux renseignements que peut fournir l'analyse micrographique ; bien souvent elle permet de différencier des tourteaux identiques par leur analyse chimique et d'en déceler les falsifications.

Enfin, un chapitre est consacré à l'examen des tourteaux en lumière ultraviolette filtrée sur un écran de Wood. A la vérité de tels examens nécessitent un outillage complexe dont peu de laboratoires peuvent disposer. Mais cette méthode de contrôle offre de telles certitudes qu'il conviendrait d'en étendre l'emploi.

L'École de Médecine et de Pharmacie de Montpellier a toujours été en France un très important centre d'étude de la Botanique ; c'est dans cette ville que Henri IV fit installer en 1598 le premier jardin botanique officiel qui ait existé dans notre pays. La lecture de l'ouvrage de MM. JUILLET, SUSPLUGAS et COURP montre qu'ils ont tenu à honneur de maintenir les traditions de l'Université à laquelle ils appartiennent.

Mais la connaissance botanique des oléagineux n'est pas tout ; les tourteaux sont des sous-produits de l'huilerie et l'on ne saurait les bien connaître sans posséder des notions suffisantes sur les procédés techniques qui permettent de séparer des graines oléagineuses ce qui est « lipides » de ce qui ne l'est point. Au cours des 30 ou 40 dernières années l'industrie huilière a grandement

(1) Un vol. 25 × 16,5. 640 pages-100 figures, 31 tableaux, 27 plages-1 vol. broché-prix frs 9.000 Editions Paul Lechevalier 12 Rue de Tournon-Parrs 6e. (1955.)

transformé ses méthodes. Les anciennes « galettes » qui ont donné leur nom aux résidus de pression de graines oléagineuses ne seront bientôt plus qu'un souvenir. Dans certains pays, les tourteaux s'appellent aujourd'hui « grenailles » parce qu'ils se présentent sous la forme de grains ou d'écailles cornés ne contenant que très peu d'huile résiduaire. Les auteurs ont estimé avec raison qu'un chapitre consacré à la production industrielle des tourteaux avait sa place tout indiquée dans leur ouvrage. Bien que très condensé ce chapitre peut fournir aux « analystes » une documentation indispensable et suffisante.

La partie concernant l'analyse chimique des tourteaux est condensée en un chapitre spécial qui compte une vingtaine de pages. Il est trop succinct, à notre gré ; toutefois il est complété par les indications données à propos du dosage de diverses substances nocives contenues dans les tourteaux de coton, de lin, de colza et autres graines de crucifères. Cette documentation spéciale figure dans les monographies traitant des principaux oléagineux ; le lecteur y trouvera en outre de nombreux renseignements bibliographiques qui lui permettront éventuellement d'étendre et d'approfondir ses connaissances.

Signalons enfin l'importance donnée aux monographies portant sur les graines de crucifères, les graines de lin, de coton et d'arachides dans lesquelles des données d'ordre statistique et économique nombreuses complètent les renseignements d'ordre botanique, technologique et chimique.

En résumé, cet ouvrage qui a coûté beaucoup de travail est écrit avec compétence, précision et clarté. Il rendra sûrement de grands services à tous ceux qui s'intéressent à l'étude des oléagineux ; le seul reproche qu'on peut lui faire est son prix élevé justifié, malgré tout, par les très nombreux tableaux, planches et figures qui en sont la partie la plus étudiée et la plus précieuse.

Émile ANDRÉ.

AN INTRODUCTION TO THE BIOLOGY OF YEASTS

PAR

M. INGRAM

Ce manuel, écrit par un biochimiste, présente un vif intérêt, non pas en tant qu'étude originale, mais comme mise au point des travaux les plus récents, particulièrement au point de vue de la physiologie des levures. Celle-ci a fait de grands progrès depuis quelques années ; c'est pourquoi c'est la partie de la biologie sur laquelle l'auteur insiste plus particulièrement.

Le plan est le suivant : après avoir exposé rapidement la morphologie et la cytologie des levures, et plus en détail, leur composition chimique, l'auteur passe des processus de métabolisme les plus simples aux plus complexes, et de là, aux processus de croissance et de reproduction.

Fermentation

La fermentation est étudiée sous 2 points de vue : d'abord, celui de la nature du processus de fermentation ; puis celui des substances fermentées et de la manière dont elles sont attaquées (l'énoncé des lois de KLUYVER-DEKKER sert de point de départ à l'étude de la fermentation alcoolique par les levures).

Après un rappel des différentes étapes des travaux sur la fermentation, le schéma de EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS est longuement exposé, avec une clarté remarquable, en insistant particulièrement sur la difficile question du transfert des phosphates et de l'énergie et des systèmes enzymatiques. Cependant, tout en reconnaissant la logique de ce système, l'auteur fait remarquer que ce n'est qu'une possibilité, que la fermentation peut être un phénomène indépendant de la phosphorylation, et de plus, qu'il peut être dangereux de généraliser pour toutes les levures des travaux qui n'ont porté que sur certaines races très particulières de *S. cerevisiae*, et sur des extraits de levures, non sur des levures vivantes.

Le mécanisme de la dégradation de chacun des sucres fermentescibles est ensuite étudié en détail, ce qui est particulièrement intéressant pour expliquer les caractères de fermentation utilisés dans la systématique des levures, ainsi que les lois de KLUYVER-DEKKER.

Respiration et effet Pasteur

De nombreuses hypothèses ont été émises concernant le mécanisme de la respiration exogène, avec les flavoprotéines ou les cytochromes comme

(1) Pitman et Sons, Londres 1955 — 12 planches, nombreux tableaux et figures, relié, prix 25.

transporteurs d'H, ainsi que celui de la dégradation des matières carbonées, pour lesquelles on suppose 4 possibilités :

— L'oxydation « directe » (DICKENS et GLOCK, 1952) du glucose 6-phosphate avec comme intermédiaires des lactones phosphorylées, puis le ribose-5-phosphate se dégradant lui-même ou en tétrose, ou en corps en C_3 et C_2.

— Le cycle de l'acide citrique ou cycle de KREBS (BALDWIN, 1952 ; OCHOA, 1951) : l'acide phosphopyruvique est oxydé en acétate, qui s'unit avec une molécule d'acide oxalacétique pour donner de l'acide citrique. Celui-ci est dégradé par des hydrogénations et décarboxylations jusqu'au stade acide oxalacétique qui rentre dans le cycle, tandis que l'acide pyruvique se trouve oxydé en CO_2 et eau.

— L'oxydation de l'acétaldéhyde (GOTTSCHALK, 1941) produit à partir des trioses-phosphates, par l'intermédiaire de l'acide glycérique.

— L'oxydation de l'alcool éthylique provenant de la fermentation (ALDOUS, 1950).

L'effet général de l'oxygène est de troubler le système de la zymase, mais il peut intervenir en de si nombreux points que les réactions sont nécessairement très complexes, et tous les systèmes envisagés peuvent se trouver réalisés simultanément ou successivement.

L'étude de l'effet Pasteur est celle de l'antagonisme entre respiration et fermentation.

On propose de l'effet Pasteur 3 explications possibles :

1° Oxydation des produits intermédiaires de la fermentation : c'est celle de PASTEUR lui-même.

2° Resynthèse des produits intermédiaires de la fermentation (BLACKMAN, MEYERHOF).

3° La formation des produits intermédiaires de la fermentation ne se fait pas, les processus de la respiration et de la fermentation divergent dès le début (LIPMANN, MELNICK).

Le mécanisme est difficile à élucider ; il est difficile de croire à un rapport quantitatif entre les respirations aérobie et anaérobie, ce rapport variant beaucoup selon les levures et les conditions. Il est donc vraisemblable qu'il n'y a pas d'explication générale, l'oxygène pouvant intervenir de différentes manières dans les différents cas.

Assimilation du carbone

L'auteur s'appuie sur les travaux de CLIFTON (1946).

Les levures sont capables d'assimiler le carbone aussi bien en anaérobiose (dans les premiers stades de la fermentation, elles peuvent stocker 30 p. 100 du sucre pouvant être mis en réserve sous forme de glycogène) qu'en aérobiose, à partir d'aliments carbonés très variés, pour donner des carbohydrates.

Les réactions de l'assimilation semblent se faire par l'intermédiaire de composés phosphorylés riches en énergie produits par la respiration, et probablement aussi par le cycle de l'acide citrique. Une remarque intéressante : en utilisant du C radioactif, on a pu mettre en évidence le fait que le CO_2 produit par la fermentation pouvait être en partie resynthétisé pour donner de l'acide lactique.

L'auteur traite ensuite de la synthèse des graisses, ses conditions (une forte aération, une teneur suffisante en vitamine B et en phosphates, un fort

rapport carbone/azote) et son mécanisme, encore mal connu ; on suppose des réactions d'aldolisation conduisant à la formation des acides gras, et l'intervention d'une lipase pour synthétiser les esters du glycérol.

Métabolisme de l'azote et du soufre

Les réactions de dégradation des matières azotées consistent essentiellement en une désamination suivie d'une décarboxylation, ce qui est à l'origine des huiles de fusel formées au cours de la fermentation.

Quant à l'assimilation de l'azote, elle semble se faire surtout à la suite de la transformation des matières azotées en NH_3, la forme la plus facilement assimilée. Cependant, les acides aspartique et glutamique, ainsi que leurs amides, l'asparagine et la glutamine, jouent un rôle spécial ; ils sont aussi facilement assimilés que NH_3, ou même plus facilement ; ils agissent comme réserve de NH_3, ils sont le premier stade de la synthèse des protéines par les levures, le 2e étant la formation de chaînes polypeptidiques. Cependant, les levures peuvent parfois intégrer directement les amino-acides aux protéines. Ces processus sont sous la dépendance de vitamines, que l'auteur étudie en détail.

Le soufre inorganique, surtout sous la forme sulfate, est utilisé par presque toutes les levures, et la méthionine sulfurée par toutes les levures. Pour Schanderl (1952), la tolérance à SO_2 de certaines levures serait due au pouvoir qu'elles possèdent de le transformer en SH_2. Ce SH_2 sert de point de départ pour la synthèse des composés possédant le groupement — SH puis — S — S — (glutathion).

Dans le chapitre suivant : **Aspects spéciaux du métabolisme des levures,** l'auteur passe en revue quelques phénomènes intéressants :

Réactions secondaires de la fermentation

Production importante d'acides organiques, souvent réduits à nouveau en aldéhydes et alcools selon les conditions d'aération, et formation d'esters.

Réduction phytochimique : les levures sont capables de réduire un grand nombre de substances tout à fait étrangères à celles rencontrées au cours de leur métabolisme (Neuberg, 1949), l'agent responsable de ces réductions est la dihydrocozymase, couplée avec d'autres enzymes.

Réactions propres à l'acétaldéhyde : réactions de dismutation et d'aldolisation — production d'acétylméthylcarbinol par condensation de l'acétaldéhyde et de l'acide pyruvique et réduction de ce corps en 2-3 butylèneglycol — production d'acétal — formation en anaérobiose des acides succinique et citrique.

Toutes ces réactions secondaires sont d'une grande importance et pourraient être très utiles pour la conduite et le contrôle des fermentations.

Adaptation aux sucres fermentescibles

Ce paragraphe présente un grand intérêt car il permet d'expliquer les difficultés qu'on rencontre dans la classification des levures basée sur les caractères de fermentation. On peut en effet distinguer la fermentation « consti-

tutive » et la fermentation « adaptative ». L'adaptation peut être très rapide, ou lente, et dépendre des conditions, ce qui complique singulièrement le problème.

Plusieurs explications de l'adaptation ont été proposées telles que la sélection d'une minorité de levures qui se développent plus rapidement, un changement de perméabilité des cellules, la nécessité de synthétiser un coenzyme. Si ces hypothèses se vérifient dans certains cas, elles sont insuffisantes pour une explication générale du phénomène : on suppose plutôt que le facteur décisif est la synthèse des protéines spécifiques des enzymes de fermentation. Cependant, se basant sur le fait que adaptation et dé-adaptation demandent de l'énergie, et sur l'étude de la phase d'induction précédant la fermentation adaptative, SEVAG (1946) suppose l'intervention de la phosphorylation ; l'adaptation dépendrait non de la production de nouveaux enzymes mais de la production de quantités catalytiques d'hexoses-phosphates.

Organisation biochimique des levures

Des différents processus du métabolisme de la levure, seule la fermentation peut être reproduite in vitro.

La cellule est une unité parfaitement organisée ; l'auteur essaye d'établir une corrélation entre l'organisation biochimique d'une part, les constituants et les structures visibles d'autre part. Des expériences de pénétration de substances (CONWEY et DOWNEY, 1950) font penser qu'il existe une « chambre métabolique externe » qui serait séparée du centre de la cellule par une membrane interne ; la région externe correspondrait à la paroi cellulaire et la membrane interne à la surface du cytoplasme. La membrane cellulaire est donc douée d'une perméabilité sélective ; les mitochondries portent une partie des enzymes et transportent entre autres les cytochromes, tandis que d'autres restent en solution dans le cytoplasme (catalase, carboxylase). Les mitochondries sont peut-être aussi le siège des réactions du cycle tricarboxylique et de l'estérification du phosphate inorganique, tandis que l'activité glycolytique se trouve assurée par la partie fluide de la cellule. Quant au noyau, pauvre en enzymes respiratoires, l'énergie nécessaire doit lui être apportée par des substances fournies par le cytoplasme.

Croissance

Dans ce chapitre sont étudiés les éléments nécessaires à la croissance :

— *L'apport de C, N, S* : ce paragraphe complète le chapitre sur l'assimilation. L'auteur étudie en particulier les amino-acides et leur influence sur la croissance. WICKERHAM a émis l'opinion qu'un apport de substances de croissance permettrait à toutes les levures d'assimiler nitrates et amino-acides.

Le métabolisme du soufre (sous forme minérale ou rentrant dans la constitution d'amino-acides soufrés) est différent chez les levures cultivées et les levures sauvages : les premières, en particulier, ont perdu la possibilité de s'adapter au glutathion.

— *L'apport d'éléments minéraux* : les seuls éléments absolument indispensables sont PO_4 qui intervient dans toutes les combinaisons organiques, et K qui active l'énolase de la respiration. Beaucoup d'autres corps cependant

ont une influence favorable, par leurs propriétés d'activation, et on ne saurait les négliger si on veut arriver à un rendement optimum.

— *Facteurs du bios* : six corps sont reconnus comme indispensables à la vie de la levure : biotine — inositol — nicotinamide — acide pantothénique — pyridoxine — thiamine. Certaines levures les synthétisent, d'autres ont besoin de les trouver dans leur milieu.

L'auteur étudie le mode d'action complexe de ces « nutrilites » (analogues aux vitamines du règne animal) et insiste sur la variabilité qui se manifeste aussi dans ce domaine : des races très proches peuvent réagir de manière aussi variée que des espèces très différentes. Aussi SCHULTZ et ATKIN ont-ils proposé d'utiliser ce caractère pour différencier les races d'une même espèce.

Les fonctions biologiques de ces nutrilites sont très bien connues pour certains d'entre eux (thiamine, acide panthoténique, nicotinamide), beaucoup plus obscures pour d'autres (inositol). On a admis l'opinion qu'ils seraient les précurseurs de substances qui auraient sur la croissance un effet inverse.

Le chapitre se termine par une étude de la cinétique de la croissance.

Reproduction

L'auteur n'étudie pas systématiquement ce sujet déjà bien connu, mais se contente de préciser des points importants ou nouvellement élucidés.

En ce qui concerne la reproduction végétative, il signale entre autres les points suivants : les groupes — SH catalysent peut-être les processus de division cellulaire ; d'où l'influence de l'aération sur la morphologie, la quantité d'oxygène réglant la proportion de ces groupes dans le milieu. La forme bourgeonnante unicellulaire est une adaptation aux conditions favorables, la formation du pseudo-mycélium est provoquée par un épuisement des sucres fermentescibles dans le milieu.

Après une étude des différentes formes de la reproduction sexuée chez les levures, est abordée la question de la sporulation : le déterminisme en est mal connu, les très nombreux travaux se rapportant à ce sujet font apparaître beaucoup de contradictions : il est fréquent de rencontrer des spores dans les vieilles cultures ; d'autre part, beaucoup de levures perdent leur pouvoir de sporulation quand elles sont longtemps cultivées ; certaines levures sporulent seulement quand le milieu est épuisé, pour d'autres ce n'est pas le cas. Il semble même que les cellules doivent être très vigoureuses et bien nourries pour pouvoir produire des spores. Des milieux de sporulation basés sur des principes très différents peuvent être utilisés avec succès, parce que les conditions de la sporulation semblent différentes d'une espèce à l'autre. Elle nécessite probablement l'apport de substances de croissance, tout comme les processus complexes de reproduction des êtres plus évolués. Cette question de l'apport de facteurs du bios a été peu étudiée ; mais cette supposition est confirmée par le fait que la sporulation est parfois aidée par la présence d'autres microbes.

Génétique et variation

De nombreux types aberrants apparaissent spontanément dans les cultures de levures. Une partie de ces transformations est explicable par le mécanisme classique de l'hybridation et de la ségrégation mendélienne. Mais la

répartition des gènes n'explique pas tout, le cytoplasme peut lui-même jouer un rôle important : c'est pourquoi LINDEGREN et SPIEGELMAN ont supposé l'existence de « plasmagènes ». Des travaux récents d'EPHRUSSI conduiraient à attribuer la responsabilité des variations attribuées au cytoplasme à des particules supportant les enzymes respiratoires.

Ce mode de transmission de caractères peut être à l'origine de phénomènes jusqu'ici inexpliqués, et donner naissance à des ségrégations irrégulières.

L'auteur étudie ensuite les variations : les variations spontanées, fréquentes surtout chez les cultures très jeunes et très vieilles, et les variations induites, sous l'action de produits chimiques, de la lyophilisation, de l'irradiation (à laquelle sont sensibles les races haploïdes plus que les diploïdes), et enfin l'adaptation.

Mais quelle que soit l'origine de la transformation (ségrégation — hybridation — mutation spontanée ou induite), les changements morphologiques sont toujours analogues ; les levures rondes formant des colonies lisses donnent naissance à des cellules cylindriques ou en forme de saucisses, puis à un pseudo-mycélium, et enfin à un mycélium vrai, les colonies devenant de plus en plus rugueuses. On remarque d'autres variations, mais qui varient indépendamment de la transformation lisse → rugueuse (HENRICI). Ici encore, il est nécessaire de faire appel à la théorie des facteurs cytoplasmiques pour donner une explication à ce phénomène.

L'auteur termine par deux courts chapitres :

Les colonies de levures dans la pratique. — Il insiste sur le fait que les cellules d'une même colonie ne sont pas toutes semblables, mais se trouvant au bout de peu de temps placées dans des conditions différentes, se comportent différemment, que ce soit sur milieu liquide (formations éventuelles d'une pellicule en surface) ou sur milieu solide (hétérogénéité des colonies). Cela explique la difficulté qu'on éprouve à garder des souches absolument identiques aux levures primitives.

Ecologie des levures. — Il passe en revue les différents habitats des levures et les espèces les plus communément rencontrées dans la nature.

L. ANDRÉ.

ERRATUM

Annales de Technologie Agricole, I. 1956

Les quatre premières lignes de la page 28 doivent être remplacées par les suivantes :

d'iode, le beurre étant d'autant plus mou que l'indice d'iode est plus élevé. *Il n'existerait cependant pas de corrélation significative entre l'indice d'iode et le point de fusion*. En Nouvelle-Zélande *également*, HANSEN et SHORLAND (12) aboutissent à une conclusion *semblable*. D'après les résultats obtenus à Jouy, il ne nous a pas été possible d'établir une quelconque relation entre le point de fusion et l'un des quatre indices étudiés.

TABLE DES MATIÈRES DE L'ANNÉE 1956

I. — MÉMOIRES ORIGINAUX

Kuzdzal-Savoie (Mme S.). — Influence du stade de lactation sur les caractéristiques de la matière grasse du beurre..... 1
Deibner (L.). — Recherches sur les techniques de mesure du potentiel d'oxydoréduction dans les jus de raisin et les vins. Détermination de ce potentiel dans quelques jus de raisin et quelques vins.... 31
Flanzy (M.) et Deibner (L.). — Sur la variation des teneurs en fer dans les vins, obtenus en présence ou en absence d'une terre ferrugineuse 69
Cordonnier (R.). — Recherches sur l'aromatisation et le parfum des vins doux naturels et des vins de liqueur..... 75
Peynaud (E.) et Maurie (A.). — Nouvelles recherches sur la maturation du raisin dans le Bordelais. Années 1952, 1953 et 1954.... 111
Roussopoulos (N. C.). — Contribution à l'évolution du pouvoir tampon de quelques milieux particuliers, tels que les vins et les sols. 161
Geoffroy (R.). — Détermination qualitative et quantitative des membranes internes du grain de blé 169
Bourdet (A.). — Les protides des céréales 181
Flanzy (M.), Hugot (Mlle D.) et Causeret (J.). — Alcool éthylique et métabolisme azoté. — I. Influence de l'alcool dilué et d'un vin naturel sur la valeur de la perte azotée endogène chez le rat.. 319
Creff (R.). — Oxydations et réductions en cidrerie. Rôle de l'oxygène dissous dans les cidres 333
Deibner (L.) et Bénard (P.). — Recherches sur la maturation des vins doux naturels :
I. Influence du traitement thermique prolongé, à l'abri de l'air. 357
II. Essai de catalyseurs métalliques 377
Deibner (L.). — Potentiel d'oxydo-réduction et ses relations avec les propriétés organoleptiques des vins doux naturels 399
Lafon (J.) et Couillaud (P.). — Étude du dosage colorimétrique des alcools supérieurs dans les eaux-de-vie..... 417
Bouzigues (Mme L.) et Bouzigues (M.). — Dosage électrophotométrique des traces de manganèse dans les moûts et les vins..... 429
Raibaud (P.). — Sur l'emploi d'une bactérie thermophile pour un dosage rapide de la nisine 441
Galzy (P.) et Marie (R.). — Observations sur la dégustation des denrées alimentaires 459
Galzy (P.). — Nomenclature des levures du vin..... 473
Plommet (M.). — L'ébullition domestique du lait. Son action sur la flore microbienne et les constituants du lait 493

Randoin (Mme L.) et Causeret (J.). — La valeur nutritive des protides du lait peut-elle être affectée par le caillage et par l'élimination du lactosérum 521
Randoin (Mme L.) et Causeret (J.). — Recherches préliminaires sur l'utilisation digestive et sur la valeur biologique des protides de diverses espèces de fromages 527
Bejambes (Mlle M.), Mocquot (G.) et Pauthe (Mlle P.). — La conservation par divers antiseptiques des échantillons de lait destinés aux analyses 539
André (E.) et Maille (Mlle M.). — Contribution à l'étude des substances insaponifiables des huiles de graines de crucifères..... 557
Patron (A.), Swinzow (H.) et Michel (F.). — Étude de la maturation de l'abricot (var. Canino) au Maroc, en vue de la mise en conserve. 571
Bidan (P.). — Sur quelques bactéries isolées de vins en fermentation malolactique 597
Alifax (R.) et Bejambes (Mlle M.). — Dosage simultané du fer et du cuivre dans le lait et les produits laitiers 619

II. — DOCUMENTATION

Deibner (L.). — Données actuelles sur les processus de l'oxydation de l'acide tartrique et sur la séparation chromatographique des acides organiques du vin 141

III. — BIBLIOGRAPHIE

Gachot. — Manuel des Jus de fruit 159
Juillet, Susplugas et Courp. — Les oléagineux et leurs tourteaux 635
Ingram (M.). — An introduction to the biology of Yeasts 637

Le Directeur-Gérant : B. LACLAVIÈRE.

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 7-12-1956.

Dépôt légal: 4e trimestre 1956 *N° d'impression: 150*